

Ein Beitrag zur Chemie der Folsäure und Folsäurederivate

Eine vereinfachte Synthese von Leucovorin

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von

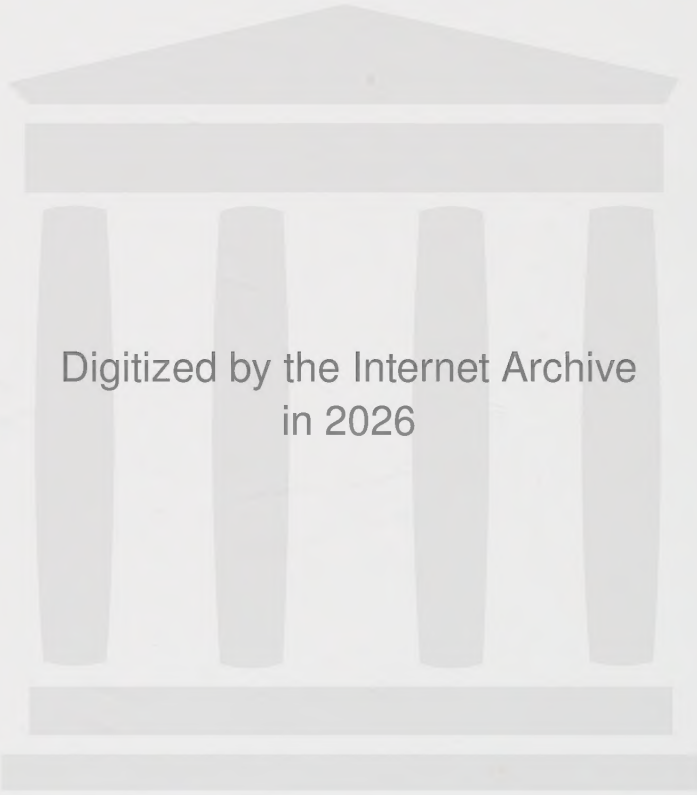
ESAM KHALIFA
aus Ägypten

begutachtet von
Herrn Prof. Dr. M. Viscontini



Juris Druck + Verlag, Zürich
1979

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Ein Beitrag zur Chemie der Folsäure und Folsäurederivate

Eine vereinfachte Synthese von Leucovorin

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich**

von

**ESAM KHALIFA
aus Ägypten**

begutachtet von
Herrn Prof. Dr. M. Viscontini



**Juris Druck + Verlag, Zürich
1979**

Ein Beitrag zur Kenntnis der Folsäure und Folatstoffwechsel

Ein vordrucktes System von Leiden

Wissenschaftliche Kommission
des Universitätsrats der Universität Leiden
gegründet am
1. Januar 1960
Vorsitz: Prof. Dr. J. H. van der Meulen
Mitglieder: Prof. Dr. J. H. van der Meulen,
Prof. Dr. J. H. van der Meulen



ISBN 3 260 04770 0

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Meinem Lehrer

Herrn Prof. Dr. M. Viscontini

spreche ich für die grosszügige Leitung dieser Arbeit, die vielen wertvollen Anregungen und das grosse Wohlwollen, das er mir stets entgegenbrachte, meinen herzlichsten Dank aus.

Herrn Dr. J.H. Bieri danke ich für sein reges Interesse und die wertvollen Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

TEIL A	EINLEITUNG	9
1.	L-Folsäure	9
2.	Folsäure-Konjugate	10
3.	Leucovorin	11
4.	Physiologische Bedeutung der Folsäure und ihrer Derivate	13
TEIL B	I. <u>Eine allgemeine Methode zur Syn- these von L-Folsäure, Folsäure- konjugaten und Folsäureanalogen</u>	15
1.	Theoretischer Teil	15
2.	Eigene Arbeiten	17
	II. <u>Eine neue Synthese von Leucovorin</u>	23
1.	Theoretischer Teil	23
1a.	Reduktion von Folsäure	23
1b.	Herstellung von Leucovorin	25
2.	Eigene Arbeiten	26
	III. <u>Regiospezifische Deuterierungen in Folsäure</u>	31
1.	Theoretischer Teil	31
2.	Eigene Arbeiten	32
2a.	Deuterierung der L-Folsäure an C(9)	33

2b. Deuterierung der L-Folsäure an C(7) und C(9)	35
2c. Deuterierung der L-Folsäure an C(7)	36
 IV. <u>Konformationsanalyse des Gemisches</u> <u>der Diastereomeren 5,10-Methenyl-</u> <u>(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-fol-</u> <u>säure</u>	 40
1. Theoretischer Teil	40
2. Eigene Arbeiten	41
 TEIL C EXPERIMENTELLER TEIL	 47
 TEIL D ZUSAMMENFASSUNG	 62
 TEIL E LITERATURVERZEICHNIS	 63

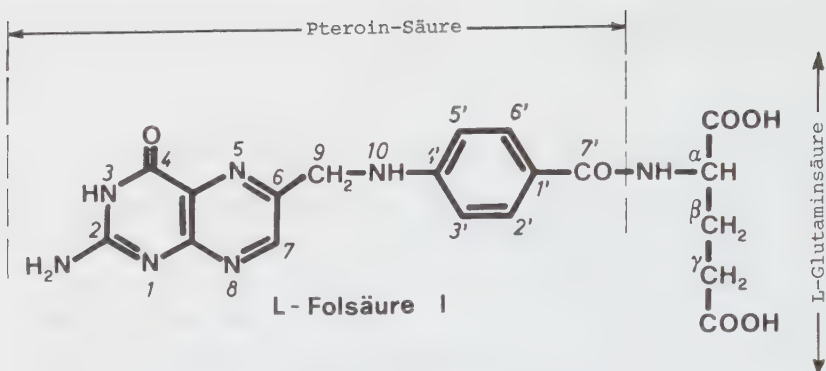
TEIL A EINLEITUNG

1. L-Folsäure (I)

L-Folsäure (I) gehört zu einer Gruppe natürlicher Verbindungen mit zahlreichen Struktur-Varianten, wie z.B. den Folsäure-Analogen, welche möglicherweise bis zu 150 verschiedene Vertreter umfasst. Da der menschliche Organismus die Folsäure-Analogen nicht synthetisieren kann, bilden diese einen unentbehrlichen Bestandteil der Nahrung. Durch Folsäuremangel verursachte Anämie ist die häufigste auf Vitaminmangel (Hypovitaminose) zurückzuführende Krankheit. Diese Hypovitaminose wird am deutlichsten sichtbar während der Schwangerschaft, bei Alkoholismus, Krankheiten des Verdauungssystems und "neoplastic diseases" [1,2], sowie im Zusammenhang mit einigen wenigen angeborenen Defekten im Folsäure-Metabolismus [3].

Die Folsäure (I) nimmt an verschiedenen Stoffwechselvorgängen teil, welche auf der Übertragung eines C_1 -Bausteines beruhen: Umwandlung von Glycin in Serin, Methylierung von Äthanolamin zu Cholin und von Homocystein zu Methionin, Biosynthese des Thymins, der Purine, usw. I ist ausserdem unentbehrlich für die normale Entwicklung der roten und weissen Blutkörperchen. So setzt man L-Folsäure (I) zur Therapie verschiedener Arten von Anämie ein. Ihre Beziehung zum Vitamin B_{12} ist noch ungeklärt. Beide Substanzen werden jedoch für den Aufbau der roten Blutkörperchen, der Desoxyribonucleinsäure etc. benötigt.

L-Folsäure (I) ist ein Kondensationsprodukt aus Pteroin-säure und L-Glutaminsäure:



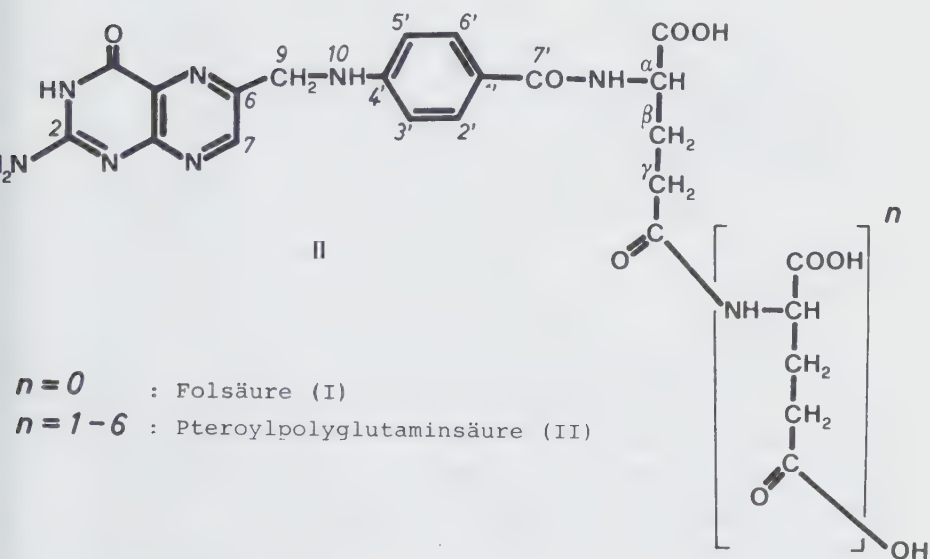
I ist enthalten in Leber [4,5], Hefe [6], verschiedenen Mikroorganismen, aber auch in Gemüsearten, wie zum Beispiel Spargel und Spinat [7]. Wegen ihrer Isolierung aus Spinatblättern bekam die L-Folsäure (I) ihren Namen (lat. *folium*, Blatt) [7].

Durch klassische Abbaureaktionen wurde gezeigt, dass L-Folsäure (I) aus 6-Methylpterin, p-Amino-benzoesäure und L-Glutaminsäure aufgebaut ist, wobei die zwei letzten Bausteine peptidisch miteinander verknüpft sind. Die Struktur wurde als [(2-Amino-4-oxy-6-pteridyl)-methyl]-p-aminobenzoyl-L-glutaminsäure (I) bestimmt [8]. Die Synthese erbrachte zugleich den Beweis für die Richtigkeit der gefundenen Struktur [8-13].

2. Folsäure-Konjugate

Die in der Natur vorkommenden Folsäure-Derivate tragen häufig nicht nur eine L-Glutaminsäure-Einheit, sondern 2-7 Glutaminsäuren mit jeweils γ-peptidischer Bindung und werden als Pteroylpolyglutaminsäuren (Folsäure-Kon-

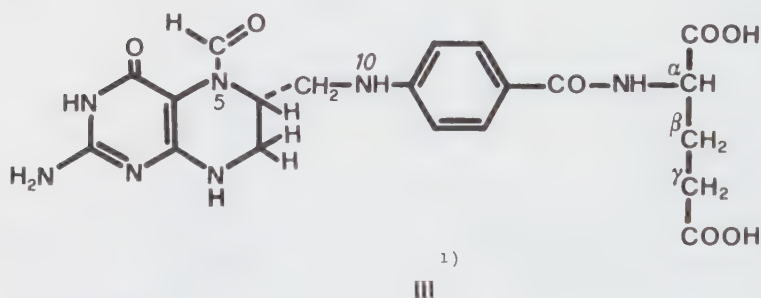
jugate (II)) bezeichnet [14]. Diese Konjugate sind in der Natur weit verbreitet. Pteropterin, der Hefe-L.Ca-sei-Faktor, stellt eine Pteroyl- γ -glutamyl- γ -glutamyl-glutaminsäure ($n=2$) dar. Das Vitamin-B_C-Konjugat stellt eine Pteroyl-hexaglutamyl-glutaminsäure ($n=6$) dar.



3. Leucovorin

Leucovorin (III), eine 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure, auch citrovorum-Faktor oder als Folinsäure bezeichnet, wurde aus Leber isoliert und als Wachstumsfaktor für den Mikroorganismus *Leuconostoc citrovorum* erkannt [15]. In letzter Zeit ist auch die therapeutische Wirkung von Ca-Leucovorin (Ca^{2+} . III) wiederholt bestätigt worden.

Besonderes Interesse fanden die Anwendungen des Leucovorin (III) zur Herabsetzung der Toxizität von Folsäureantagonisten bei der Krebsbekämpfung [16] und zur Behandlung der megaloblastischen Anämie [17]. Die physiologische Wirkung von Ca-Leucovorin wird gegenwärtig intensiv erforscht.



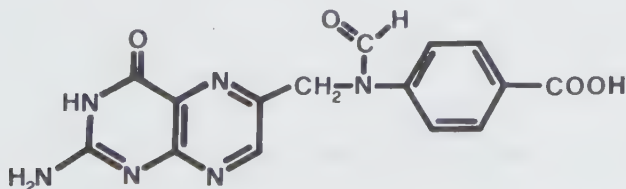
Beim Problem der Strukturaufklärung von III stand vor allem die Frage nach der Stellung der Formylgruppe im Vordergrund [18,19]. Einen Beweis für die Verknüpfung der Formylgruppe mit dem Tetrahydropyrazinring ergaben polarographische Untersuchungen von Allen und Mitarbeitern [20]. Bei pH 9 fanden sie für Pterine, 7,8-Dihydropterine und 5,6,7,8-Tetrahydropterine jeweils charakteristische Halbwellenpotentiale, während Pyrimidine und p-Amino-benzoyl-glutaminsäure nicht reduziert werden. 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (III)

1) Alle in dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen, welche ein 5,6,7,8-Tetrahydropterin-Gerüst enthalten, wurden willkürlich in der 6R-Form gezeichnet. Ausnahmen finden sich bei den N(10)-Nitroso-, 5,10-Methenyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-Derivaten sowie in den Verbindungen XVII und XXVI.

gibt ebenfalls keine Welle im Polarographen, doch nach Behandlung mit verdünnter Säure, die zum Verlust der mikrobiologischen Aktivität für *P. cerevisiae* führt, wird das charakteristische Potential eines Tetrahydropterins gefunden.

4. Physiologische Bedeutung der Folsäure und ihrer Derivate

Verschiedene Autoren berichten über die physiologische Wirkung von L-Folsäure (I). Wills [21] und Stewart [22] wandten sie erfolgreich gegen tropische macrocytische Anämie an. Weitere Aktivitäten sind die Beschleunigung der Milchsäuregärung sowie die Wachstumsförderung von *Streptococcus faecalis* [6,7,23]. Bei der Untersuchung zahlreicher weiterer Faktoren der Folsäuregruppe stellte sich heraus, dass am Aufbau der Moleküle stets p-Aminobenzoessäure beteiligt ist. Diese ist bereits in freier Form ein wirksamer Wachstumsfaktor für Bakterien, oder anders ausgedrückt, ein Vitamin für Mikroorganismen. In gebundener Form, z.B. als Folsäure (I), Rhizopterin (das aus *Rhizopus nigricans* isoliert wird) (N(10)-Formylpteroinsäure), Leucovorin (III) [24], etc., stellt sie ein Vitamin für Tier und Mensch dar, so dass p-Aminobenzoessäure, die Folsäure (I) und ihre Derivate im Prinzip nur verschiedene Zustandsformen des gleichen biologischen Wirkstoffes darstellen.



Rhizopterin

Orale Einnahme von L-Folsäure (I) erzeugt beim Menschen einen vorübergehenden Anstieg der Folsäure-Derivate im Serum oder Plasma [25-27] sowie im Urin [25-28]. Auch die Folsäure-Konjugate zeigen physiologische Wirkungen. Boothe et al. haben eine Beeinflussung der Folate in ihrer Verwendbarkeit als Wachstumsfaktoren mit der Länge der Peptidkette festgestellt. Andere Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen der Zahl der Glutaminsäure-Reste und der Art der Aminosäuren bei der Bildung von Coenzym-Apoenzym-Komplexen [29]. Ferner werden mögliche Mechanismen für die Absorption und die Umwandlung der Pteroyl-polyglutaminsäuren in der Darmschleimhaut diskutiert [30].

Über den Mechanismus der intrazellulären Anreicherung von Folaten ist wenig bekannt. Experimente scheinen zu zeigen, dass ein System existiert, welches die Folate aktiv durch die Zellmembranen transportiert [31], doch sind keine Angaben über die Struktur des Trägersystems oder die Art des Transportes und deren Wirkungsweise bekannt. Immerhin scheint ein lediglich durch Diffusion bestimmtes Eindringen der Folate in die Zellen ausgeschlossen [14].

Die Ausscheidung von Folaten und deren Derivate erfolgt beim Menschen hauptsächlich über den Harnweg [32]. Die normale Ausscheidungsrate von 2 µg in 24 Stunden reicht jedoch zu einer Analyse der Folsäure-derivate nicht aus. Es ist jedoch bekannt, dass Isoxanthopterin und L-Biopterin normale Bestandteile des menschlichen Urins darstellen [14]. Die erste Substanz ist möglicherweise ein Produkt des oxidativen Abbaus von reduzierten Folsäurederivaten. Dagegen scheint L-Biopterin eher durch Biosynthese als durch Abbau von Folaten zu entstehen.

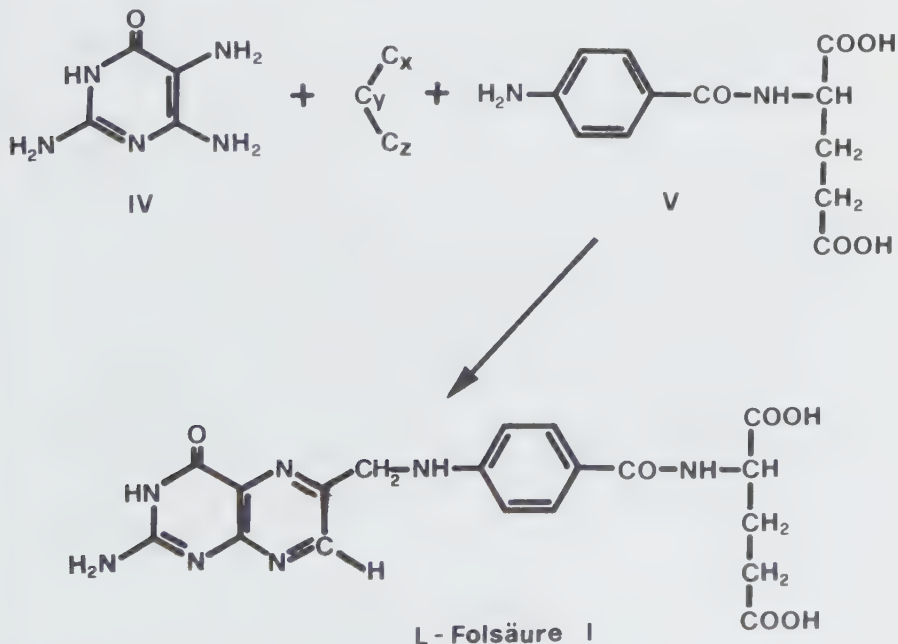
Teil B

I. Eine allgemeine Methode zur Synthese von L-Folsäure, Folsäurekonjugaten und Folsäureanalogen

1. Theoretischer Teil

L-Folsäure (I) wurde bereits früher in mehreren Laboratorien synthetisiert [8-13]. Pterine dieser Gruppe sind gewöhnlich schwer zu isolierende Festkörper mit beschränkter Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und sehr hohen Zersetzungstemperaturen. Die Reinigung solcher Verbindungen ist schwierig und verlangt die Anwendung spezieller Verfahren.

Fast alle bisher veröffentlichten Folsäuresynthesen benutzten die Kondensation von 2,4,5-Triamino-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidin (IV) mit p-Amino-benzoyl-L-glutaminsäure (V) und einem Dreikohlenstoffkörper nach dem folgenden allgemeinen Prinzip:



Als Dreikohlenstoffkörper eignen sich viele Verbindungen, die Carbonyl- und/oder Halogenfunktionen als reaktive Gruppen (X-Y-Z) tragen. Für die Kondensationsreaktion können grundsätzlich drei Wege beschriftet werden:

- a) Die gleichzeitige Kondensation aller drei Komponenten in einem "Eintopfverfahren".
- b) Die Synthese des Pteringerüsts aus Pyrimidin und Dreikohlenstoffkörper und anschliessende Kondensation mit der p-Amino-benzoyl-glutaminsäure (V).
- c) Die Bildung einer Zwischenverbindung aus p-Amino-benzoyl-glutaminsäure (V) und Dreikohlenstoffkörper, die dann mit dem Pyrimidin kondensiert wird.

Die Ausbeuten für alle drei beschriebenen Methoden waren nur gering, und es entstanden zahlreiche inaktive Nebenprodukte, insbesondere das in 7-Stellung substituierte Isomere. Karrer und Schwyzer [33] konnten die Ausbeute steigern, aber auch ihr Produkt war nicht einheitlich. Erst mit der Synthese von isomerenfreiem 6-Formylpterin (VI, $R_1 = H$) konnten Bieri und Viscontini [34] eine regiospezifische, ausschliesslich in 6-Stellung substituierte L-Folsäure (I) erhalten.

Für die Folsäurekonjugate II mit 2 bis 7 Glutaminsäureeinheiten sind bis heute im wesentlichen zwei Synthesewege bekannt. Ein erster verläuft analog der "klassischen" Folsäuresynthesen [35,36]: Aufbau eines p-Amino-benzoyl- γ -L-polypeptides (festgelegte Kettenlänge, definierte Stereochemie), Kondensation mit 2,4,5-Triamino-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidin (IV) und α,β -Dibrom-propionaldehyd (mühsame Reinigung, kleine Ausbeuten, zahlreiche inaktive Nebenprodukte, Isomerengemische) [37]. Ein

zweiter verwendet, sowohl für den Aufbau der Peptidkette als auch für die anschliessende Kopplung des Peptidteiles mit Trifluoracetyl-Derivaten von Pteroin-säure, die Methode des "mixed anhydride coupling" [29,38,39]: Mischung verschiedener Konjugate mit unterschiedlichen Polypeptid-Kettenlängen, acetylierte Nebenprodukte, aufwendige Trennung und Aufarbeitung.

2. Eigene Arbeiten

Nachdem es Viscontini und Mitarbeitern gelungen war, das isomerenfreie 6-Formylpterin (VI, $R_1 = H$) leicht zu erhalten, war es das Ziel, eine neue, einfache und all-gemeingültige Synthese für die wichtige Gruppe der Folsäure-Derivate zu entwickeln, bei welcher kristalline Zwischenprodukte zur Anwendung kommen. Im folgenden wird die Darstellung von L-Folsäure (I) und seiner Derivate mit guten Ausbeuten und hohen Reinheiten bei einem Minimum an komplizierten Reinigungsschritten beschrieben.

Die Synthese erfolgt über ein N(2')-Acetyl-6-azomethin-pterin (VIII, $R_1 = CO-CH_3$) und führt über zwei weitere Stufen zum Endprodukt X (Schema 1 und Tabelle 1).

Dabei wird N(2')-Acetyl-6-formyl-pterin (VI, $R_1 = CO-CH_3$) mit den aromatischen Aminen VII in abs. Äthanol umgesetzt. Die mit guten Ausbeuten gebildeten Schiffischen Basen VIII werden direkt aus der Reaktionslösung 7-isomerenfrei und kristallin erhalten [40].

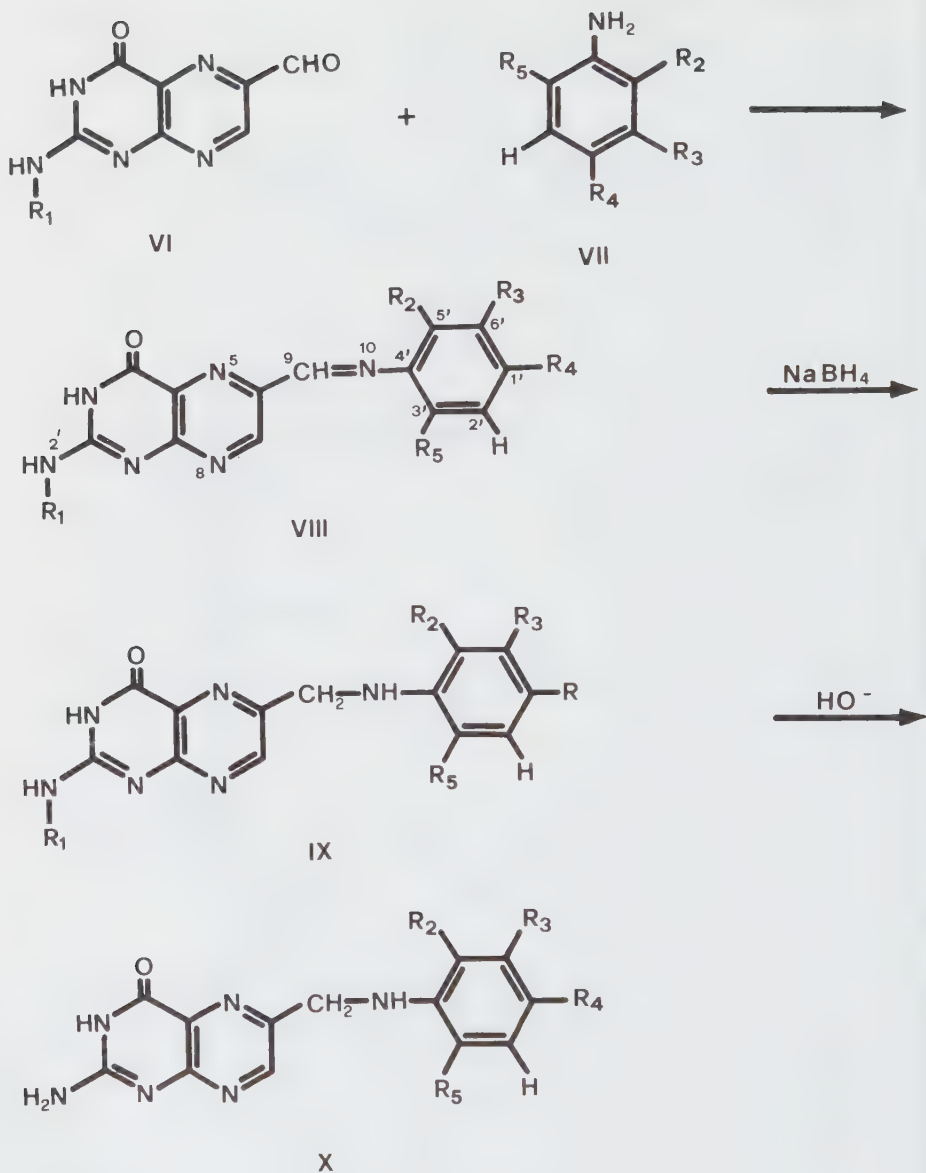
Die Kondensationsprodukte VIII werden darauf in Äthanol/Wasser mittels Natriumborhydrid zu den N(2')-Acetyl-6-amino-methyl-pterinen (IX, $R_1 = CO-CH_3$) reduziert und darauf zu den 6-Amino-methyl-pterinen X alkalisch verseift.

Tabelle 1: Zusammenstellung der aus der Kondensation von N(2')-Acetyl-6-formylpterin (VI, $R^1 = \text{COCH}_3$) mit Aminoaryl-Derivaten VII in abs. Äthanol resultierenden Produkten VIII, IX und X

Aminoaryl-Derivate	Produkte
VIIa: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{CH}_3$	VIIIa, IXa: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{CH}_3$
	Xa: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{CH}_3$
VIIb: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{CONHCH}_3$	VIIIb, IXb: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{CONHCH}_3$
	Xb: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{CONHCH}_3$
VIIc: $R^2 = R^4 = \text{H}$ $R^3 = R^5 = \text{CH}_3$	VIIIc, IXc: $R^2 = R^4 = \text{H}$ $R^3 = R^5 = \text{CH}_3$
	Xc: $R^2 = R^4 = \text{H}$ $R^3 = R^5 = \text{CH}_3$
VIIId: $R^3 = \text{H}$ $R^2 = R^4 = R^5 = \text{CH}_3$	VIIIId, IXd: $R^3 = \text{H}$ $R^2 = R^4 = R^5 = \text{CH}_3$
	Xd: $R^3 = \text{H}$ $R^2 = R^4 = R^5 = \text{CH}_3$
VIIe: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{COOCH}_3$	VIIIe, IXe: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{COOCH}_3$
	Xe: $R^2 = R^3 = R^5 = \text{H}$ $R^4 = \text{COOCH}_3$

Tabelle 1: Fortsetzung

Aminoaryl-Derivate	Produkte
VIIIf: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu(OCH_3)_2$	VIIIIf, IXf: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu(OCH_3)_2$
	Xf: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu$
VIIIg: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu-OCH_3$ Glu(OCH ₃) ₂	VIIIIf, IXg: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu-OCH_3$ Glu(OCH ₃) ₂
	Xg: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu$ Glu
VIIIf: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu-OCH_3$ Glu-OCH ₃ Glu(OCH ₃) ₂	VIIIIf, IXh: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu-OCH_3$ Glu-OCH ₃ Glu(OCH ₃) ₂
	Xh: $R^2 = R^3 = R^5 = H$ $R^4 = CO-Glu$ Glu Glu

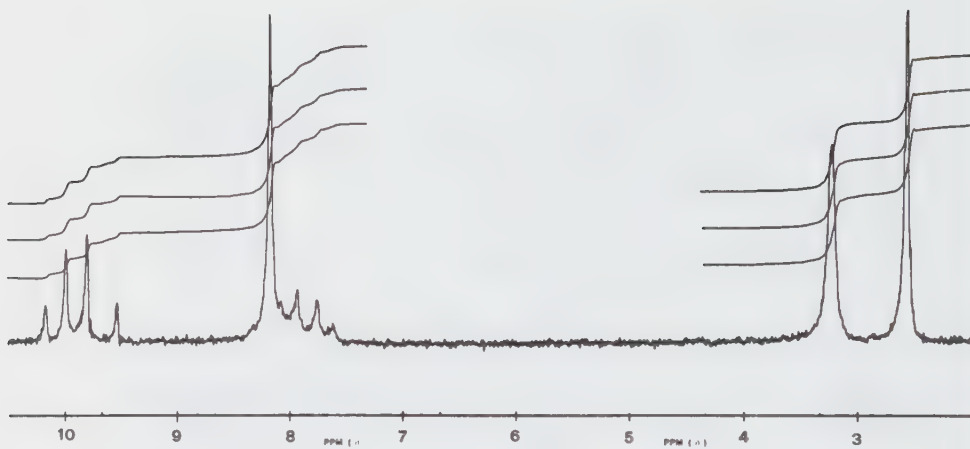


Schema 1

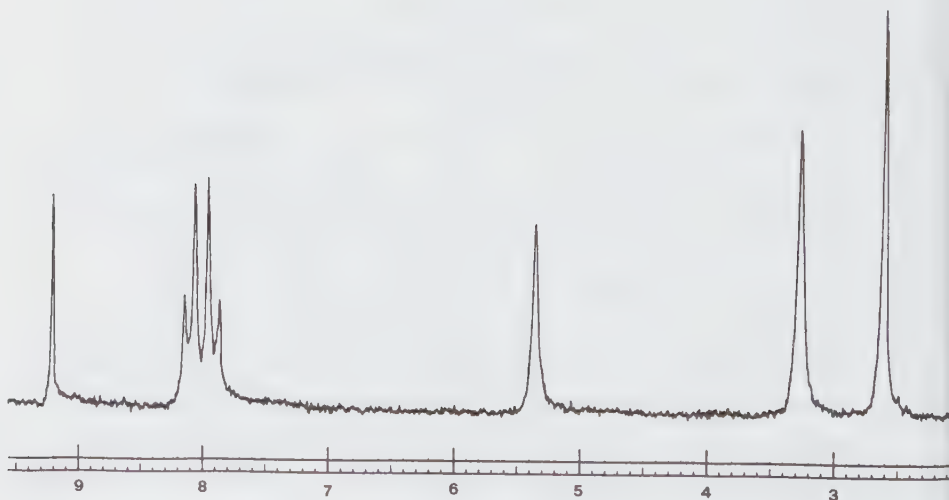
Bei den optisch aktiven Folaten VIII, IX und X wird im Verlauf der Synthese in den Glutaminsäure-Einheiten keine Razemisierung festgestellt; die beschriebene Methode erlaubt somit die Darstellung regiospezifisch und optisch reiner Produkte [40].

Die gebildeten Azomethine VIII - wie das $^1\text{H-NMR.}$ -Spektrum am Beispiel der Verbindung VIIIf zeigt (Figur 1) - liegen jeweils in einer syn- und einer anti-Form vor. Dem einen geometrischen Isomeren sind das aromatische AA'BB'-System zwischen 7,6 und 8,1 ppm sowie die Singulette bei 10,2 und 9,6 ppm für die H-C(9) und H-C(7) Protonen zuzuordnen, während das mehrheitlich vorliegende andere Isomere ein degeneriertes aromatisches AA'BB'-System bei 8,2 ppm und zwei Singulette bei 10,0 und 9,8 ppm für die H-C(9) und H-C(7) Protonen aufweist. Der Anteil des Hauptisomeren für die Verbindung Vb liegt aufgrund der Integrale bei ca. 65%. Im experimentellen Teil wird für alle Beispiele VIIIf - VIIIfh nur das jeweilige Hauptisomere charakterisiert.

Im $^1\text{H-NMR.}$ -Spektrum von N(2')-Acetyl-6-aminomethylpterin IXb (Figur 2) sind, wie zu erwarten, keine Isomere mehr vorhanden. Durch die Reduktion der Azomethin-Doppelbindung mit NaBH_4 verschieben sich die H-C(9) Protonen nach höherem Feld zu 5,34 ppm. Das H-C(7) verbleibt bei 9,2 ppm und das aromatische AA'BB'-System zwischen 8,09 und 7,91 ppm. Analog der Verbindungen VIIIfb und IXb können auch für die übrigen Verbindungen a bis h die $^1\text{H-NMR.}$ -Spektren interpretiert werden (siehe experimenteller Teil).



Figur 1: ^1H -NMR.-Spektrum (60 MHz) von VIIb in CF_3COOH



Figur 2: ^1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) von IXb in CF_3COOH

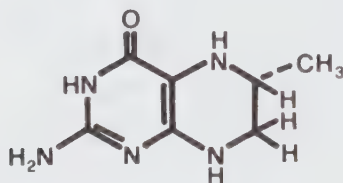
II. Eine neue Synthese von Leucovorin

1. Theoretischer Teil

1a. Reduktion von Folsäure: Der Pyrazinring der Folsäure lässt sich bereits bei milden Bedingungen hydrieren, bei denen aromatische Verbindungen und Pyrimidine noch nicht reduziert werden. Bei der Hydrierung über Platinoxid in 0,1N NaOH erhielt O'Dell [41] unter Aufnahme von einem Mol H_2 7,8-Dihydrofolsäure (XX). Die Darstellung reiner 7,8-Dihydrofolsäure erfolgt besser nach Futterman [42], durch Reduktion mit Dithionit und Ascorbat bei Zimmertemperatur. Nach einer weiteren Verbesserung durch Blakley konnten auf diesem Wege kristalline Produkte erhalten werden [43]. Führt man die katalytische Hydrierung der L-Folsäure (I) in Eisessig durch [41], so erhält man vorwiegend 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII). Die L-Folsäure (I) geht dabei in dem Masse, wie sie hydriert wird, in Lösung. Die gebildeten Produkte können durch Ausfällen mit Äther in fester Substanz gewonnen werden [44]. In konz. Ameisensäure ist L-Folsäure (I) löslich, und daher verläuft die Hydrierung rascher, doch bildet sich in Ameisensäure infolge teilweiser Formylierung kein sauberes Produkt [45]. Die Darstellung von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) ohne Katalysatoren wurde ferner von Silverman [46] und Hillcoat [47] berichtet.

Silverman erhielt bei 75° mit Dithionit als Reduktionsmittel ein Gemisch mit Hauptprodukt 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII); ebenso Hillcoat, der die Reduktion mit Borhydrid durchführte.

Viscontini und Frick [48] bemerkten aber, dass bei der katalytischen Hydrierung der L-Folsäure (I) eine Hydrogenolyse der Bindung zwischen C(9) und N(10) bis zu 30% stattfindet. Dabei werden 6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (XI) und p-Amino-benzoyl-glutaminsäure (V) als Spaltprodukte gebildet, welche für die mühsame Reinigung und schlechte Ausbeute von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) verantwortlich sind.



XI

Die Autoren schlugen eine neue Synthese für die Herstellung reiner 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) vor. Ausgehend von 7,8-Dihydrofolsäure (XX) nach Futterman [42] wird diese Verbindung mit NaBH_4 reduziert und die gebildete 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) als Dihydrochlorid isoliert.

Bei der Hydrierung der Folsäure (I) wird ein zweites chirales Zentrum am Kohlenstoffatom 6 gebildet, so dass ein Diastereomerengemisch der (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäuren (XII) entsteht. Dabei wird vorausgesetzt, dass das bereits vorhandene chirale Zentrum in der L-Glutaminsäure die Reduktion nicht merklich in eine Richtung lenkt. In Übereinstimmung mit dieser Auffassung wird das synthetische Produkt in

enzymatischen Reaktionen nur zu 50% umgesetzt [49]. Die Trennung der synthetisch erhaltenen Diastereomeren gelang bisher noch nicht. Mathews und Huennekens gewannen das natürliche Diastereomere durch enzymatische Reduktion von 7,8-Dihydrofolsäure (XX) mit Reduktase aus Hühnerleber und anschliesslicher chromatographischer Reinigung [50].

1b. Herstellung von Leucovorin: Alle bisher publizierten Methoden zur Herstellung von Leucovorin (III) gehen von der L-Folsäure (I) aus. Shive [51] und Flynn [52] formylieren zuerst die L-Folsäure (I) an N(10). Anschliessend wird das formylierte Produkt zum 5,6,7,8-Tetrahydroderivat reduziert und 2 Std. bei 120° (pH 5-6) unter Druck belassen. Brockman [53] und Roth [54] reduzieren L-Folsäure (I) katalytisch in Ameisensäure. Darauf wird die Lösung verdünnt, auf pH = 13 gebracht und 1 Std. gekocht. Bei dieser Methode erwähnen die Autoren, dass man, wenn 1 g 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) mit Ameisensäureaethylester und Natriumethylat 2 Std. bei 150° unter Stickstoff umgesetzt werden, eine Substanz erhält, deren biologischer Test mit *L. citrovorum* einer Aktivität von 0,073 mg Leucovorin (III) entspricht.

Dieses Experiment beweist, dass unter den angegebenen Bedingungen die N(5) Aminogruppe von 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) mindestens teilweise zum N(5)-Formyl-Derivat "Leucovorin" umgesetzt wird. Alle publizierten Synthesen erwiesen sich in der Anwendung als umständlich, lieferten Mischungen und, nach mindestens dreimaliger Säulenchromatographie, entsprechend geringe Ausbeuten.

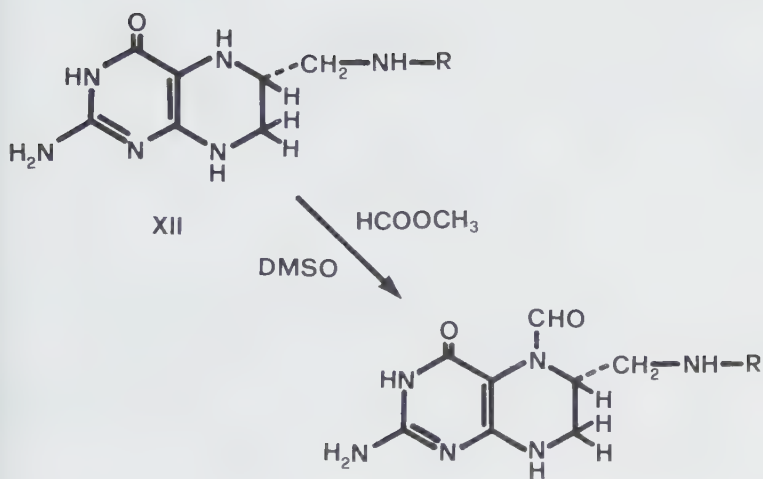
Das synthetische Leucovorin (III) wird als eine Mischung von (6R,S)-Diastereomeren erhalten und sowohl als Ca-Salz wie auch als freie Säure (pKa-Werte: 3,1; 4,8; 10,4) rein dargestellt. Über das Ca-Salz konnte das natürliche Diastereomere aufgrund geringerer Löslichkeit in optisch reiner Form erhalten werden [55]. Diese sogenannte 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (III) hat die gleiche mikrobiologische Aktivität wie der natürliche Citrovorum-Faktor.

2. Eigene Arbeiten

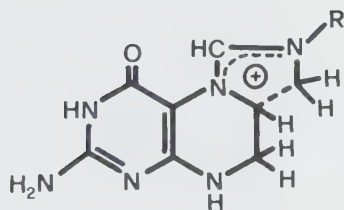
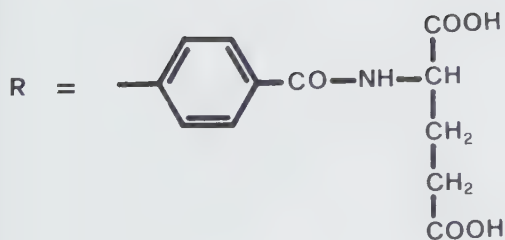
Da reine, synthetische (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) als Diastereomeren-Mischung leicht zugänglich geworden ist [56,57], haben wir nach einer neuen, geeigneten Leucovorin-Synthese mit XII als Edukt gesucht (Schema 2).

Eine direkte 5-Formylierung von XII mit Ameisensäuremethylester schien vielversprechend, weil N(5) basischer als N(10) ist und demzufolge bevorzugt einen Ester nucleophil angreifen kann. Als Lösungsmittel wählten wir Dimethylsulfoxid, weil einerseits 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure darin leicht löslich ist und andererseits die Formylierung bei neutralem pH erfolgen kann. Dies ist deshalb von grosser Bedeutung, weil in neutraler Lösung die Bildung von 5,10-Methenyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XIII) fast vollständig unterdrückt wird. Eine dreitägige Behandlung von XII mit Ameisensäuremethylester in Dimethylsulfoxid unter Stickstoff bei 22° führt zum Ziel.

Eine einzige Cellulose-Chromatographie mit Wasser als Elutionsmittel genügt, um das Leucovorin (III) in



III



XIII

Schema 2

reiner Form zu erhalten. Die Ausbeute von III als Ca-Salz beträgt 60%, bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Menge 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII).

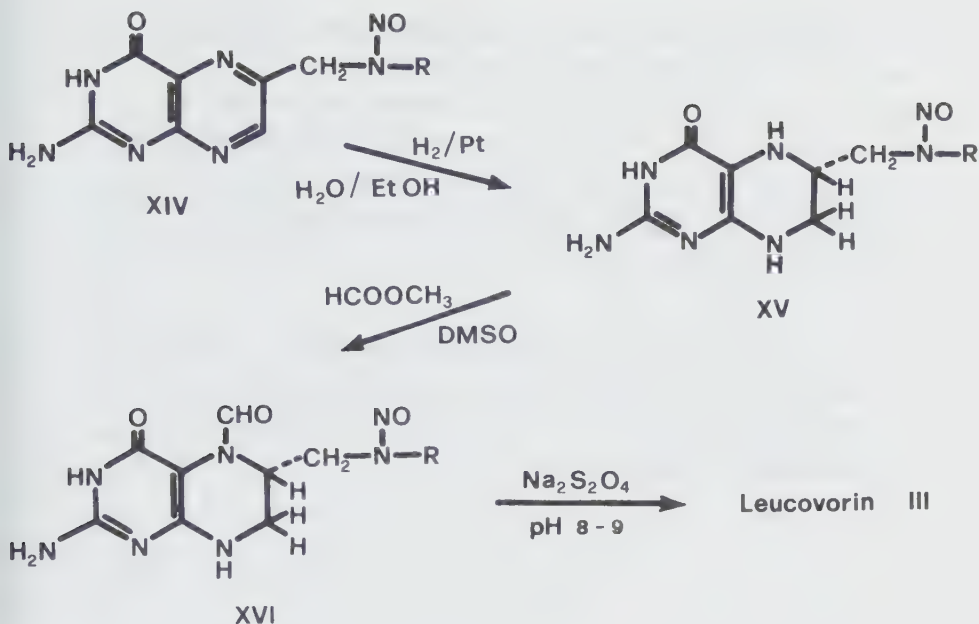
Es ist zu erwarten, dass das so erhaltene Leucovorin (III) aus einem Gemisch zweier Diastereomerer besteht. Wir konnten jedoch keine entsprechende Information aus dem ^1H -NMR.-Spektrum erhalten, so dass für die 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) sowie für das Leucovorin (III) in dieser Arbeit die (6R)-Strukturformel willkürlich verwendet wird.

Als Beweis für die Struktur-Richtigkeit des synthetisierten Leucovorins (III) wurde die gleiche Formylierung mit einer 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XV) ausgeführt, deren 10-Aminogruppe geschützt war.²⁾ Als Edukt wurde N(10)-Nitroso-L-folsäure (XIV) verwendet (Schema 3) [58,59].

Zunächst wurde versucht, 7,8-Dihydro-N(10)-nitroso-L-folsäure auf die gleiche Weise wie 7,8-Dihydro-L-folsäure herzustellen, unter Verwendung von Natriumdithionit als Reduktionsmittel. Unter diesen Bedingungen erfolgt jedoch die Abspaltung der Nitrosogruppe. Die einzig brauchbare Methode, um 5,6,7,8-Tetrahydro-10-nitroso-L-folsäure (XV) zu erhalten, ist die katalytische Reduktion von XIV in 50proz. Äthanol. Die N(10)-Nitroso-L-folsäure (XIV) geht dabei in dem Masse, wie sie hydriert wird, in Lösung.

Im Gegensatz zur L-Folsäure (I) [56] gelingt die katalytische Reduktion von XIV ohne Hydrogenolyse, wahr-

²⁾ Noch nicht publizierte Arbeit mit Ganguly, Bieri & Viscontini



Schema 3

scheinlich weil das Wasserstoffatom an N(10) durch eine Nitrosogruppe mit -I Effekt ersetzt wurde.

Die Formylierung wurde wie für 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII) ausgeführt, und N(10)-Nitroso-leucovorin (XVI) isoliert, gereinigt und charakterisiert.

Das ^1H -NMR.-Spektrum beweist, dass in XV sich die Nitrosogruppe am N(10) befindet. Die N(10)-Nitrosogruppe bedingt, dass im ^1H -NMR.-Spektrum von XIV, XV und XVI die Signale der aromatischen Protonen (AA'BB'-Systeme) bei 8,0 und 8,3 ppm nahe zueinander rücken, während jene der am N(10) nicht substituierten Folsäure-Derivate bei 7,1 und 8,05 in einem Bereich von fast 1 ppm auseinanderliegen.

Die reduktive Entfernung der Nitrosogruppe gelang, wenn XVI drei Wochen bei 22° mit Natriumdithionit (pH 8-9) behandelt wurde. Unter diesen Bedingungen wurde die 5-Formylgruppe in XVI nur teilweise hydrolysiert, während die N(10)-Nitrosogruppe fast vollständig entfernt wurde. Das so erhaltene Leucovorin (III) wurde chromatographisch gereinigt und als Ca-Salz isoliert.

Das auf den beiden aufgezeigten Synthesewegen (Schema 2 und Schema 3) erhaltene Leucovorin (III) erwies sich ¹H-NMR.-spektroskopisch und dünnschichtchromatographisch als identisch.

III. Regiospezifische Deuterierungen in Folsäure

1. Theoretischer Teil

In den letzten Jahren fanden markierte L-Folsäure und ihre 4-Amino-10-methyl-analoga (Methotrexat) häufig in der Biomedizin Anwendung, wobei meist Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung des Vitamins und seiner Antagonisten untersucht wurden.

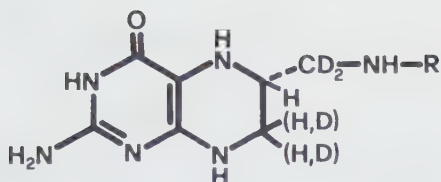
Um den Metabolismus von L-Folsäure zu studieren, verwendet man am besten spezifisch markierte Verbindungen als "Tracers". Es sind bis heute fünf Methoden bekannt, um markierte Folsäure und Methotrexat herzustellen.

- a) Die Verbindung wird mit gasförmigem Tritium versetzt [60]. Dabei ergab sich für die L-Folsäure folgende Isotopenverteilung: 22,1% im Pteridin-Teil, 28,4% in der p-Amino-benzoesäure und 47,3% in der L-Glutaminsäure.
- b) Der Platin- oder Palladium-katalysierte Wasserstoff/Tritium-Austausch in tritiiertem Wasser oder tritierter Essigsäure [60] führte zu einer gleichmässigen Verteilung von Tritium im Pterinteil und in der p-Amino-benzoyl-glutaminsäure.
- c) Katalytische Reduktion von 3',5'-Dibrom-L-folsäure mit Tritiumgas ergibt ein Produkt mit bis zu 60% des Tritiums an C(9) [61,62]. Unvollständige Bromierung, unvollständige Tritierung der Dibrom-L-Folsäure sowie teilweise Reduktion des Pyrazinringes ergaben komplexe Gemische mit sehr unterschiedlichen Isotopengehalten.

- d) L-Folsäure (I) wurde in einem Gemisch von Trifluoressigsäureanhydrid und Deuteriumoxid durch Wasserstoff/Deuterium-Austausch deuteriert [63]. Das Produkt, 3',5'-Dideuterio-Folsäure war spezifisch im p-Amino-benzoylteil deuteriert, während die C(7) und C(9) Protonen sowie diejenigen des L-Glutaminsäurerests nicht ausgetauscht wurden.
- e) In stark alkalischer Lösung von 7,8-Dihydrofolsäure (XX) wurde der Einbau von Deuterium in C(9) und C(7) beobachtet [48], wobei der Austausch am C(9) viel rascher und vollständiger erfolgt als am C(7). Der Austausch erfolgt vermutlich durch Abstraktion eines Protons an C(7) oder C(9), gefolgt von einer Imin-Enamin-Tautomerie im System N(5)-C(6)-C(7) bzw. N(5)-C(6)-C(9).

2. Eigene Arbeiten

Die im theoretischen Teil erwähnten Methoden führten im allgemeinen zu Produkten mit niedrigen Tritium- bzw. Deuterierungsgraden sowie zu unerwünschter Mehrfachdeuterierung an verschiedenen Stellen. Für die im folgenden Kapitel IV beschriebenen Arbeiten zur Konformationsbestimmung der 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure-Derivate benötigten wir spezifisch in Stellung 7 und 9 deuterierte Verbindungen mit einem Deuterierungsgrad von mindestens 95%. Nur unter diesen Voraussetzungen konnten wir die komplexen ^1H -NMR.-Spektren des hydrierten Pyrazinringes interpretieren. Wegen unvollständiger Deuterierung in Stellung 7 des Pyrazinringes der 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XVII) gelang es Frick nicht, die Konformation von XII festzulegen [48].



XVII

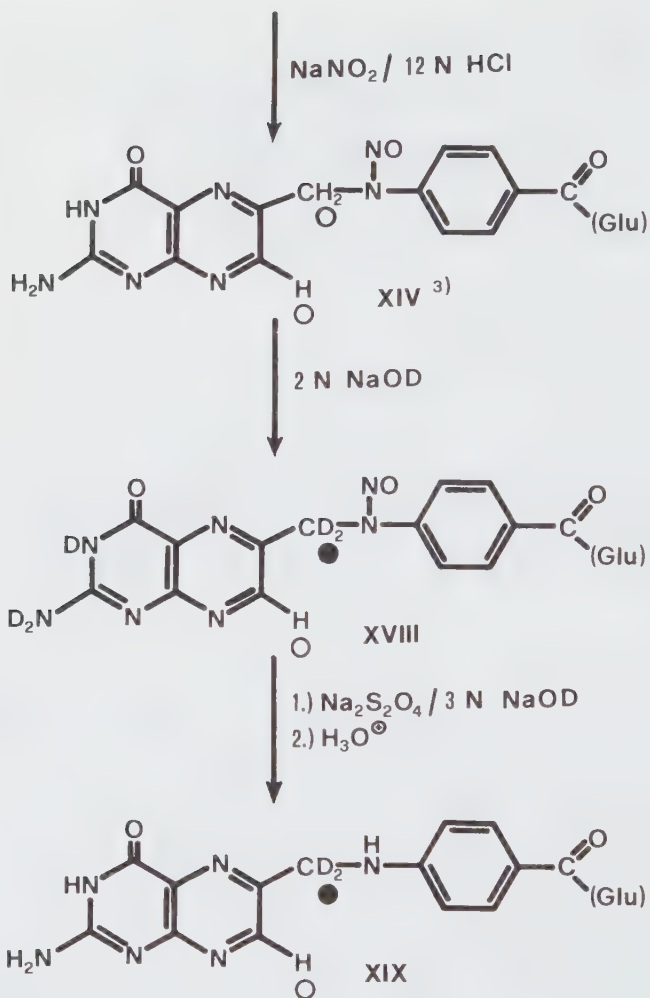
2a. Deuterierung der L-Folsäure an C(9)

In der L-Folsäure (I) sind die Wasserstoffatome an C(7) und C(9) so gebunden, dass sie weder in basischer noch in saurer Lösung gegen Deuterium ausgetauscht werden können.

Durch Einführung einer Nitroso-Gruppe mit negativ-induktivem Effekt am N(10), in α -Stellung zu C(9), gelang es, die Acidität der C(9) Protonen zu verstärken. In Natrium-deuteriumoxid-Lösung tauschten die C(9) Protonen der N(10)-Nitroso-folsäure (XIV) rasch und nahezu quantitativ ($\geq 95\%$) gegen Deuterium aus (Schema 4).

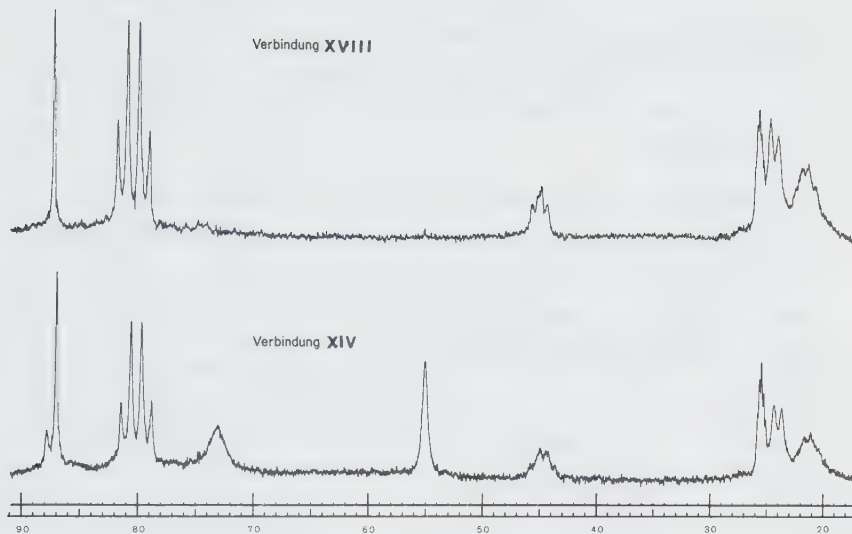
Die Nitroso-Gruppe der 9,9-Dideuterio-N(10)-nitroso-L-folsäure (XVIII) wurde anschliessend durch dreitägige Behandlung mit Natriumdithionit in 3N NaOD bei Zimmertemperatur abgespalten, wobei als Produkt die 9,9-Dideuterio-L-Folsäure (XIX) erhalten wurde.

Die ^1H -NMR.-Spektren von XIV und XVIII im $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (Figur 3) zeigen das Verschwinden der C(9) Protonen bei 5,5 ppm, während das Signal der C(7) Protonen bei 8,68 ppm unverändert erhalten bleibt.



Schema 4

³⁾ Die gegen Deuterium auszutauschenden Wasserstoffatome werden mit o markiert. Nach erfolgter ²H-Substitution wird die entsprechende Stelle mit • bezeichnet



Figur 3: ^1H -NMR.-Spektren (100 MHz) von XIV und XVIII in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

In Figur 4 ist das ^1H -NMR.-Spektrum von XIX dargestellt. Das Signal der C(7) Protonen bei 8,8 ppm bleibt unverändert, während das Singulett der beiden C(9) Protonen verschwunden ist.

2b. Deuterierung der L-Folsäure an C(7) und C(9)

Zur Darstellung von 7,9,9-Trideuterio-L-folsäure (XXII) wurde I vorerst zu 7,8-Dihydro-folsäure (XX) reduziert [42,43]. Darauf konnten über die N(5),6-Iminstruktur in XX basenkatalysiert die dazu α -ständigen C(7) und C(9) Wasserstoffatome gegen Deuterium ausgetauscht werden [48]. (Dieses Ergebnis stimmt nicht mit denen in [62] angegebenen überein. Darin wird mitgeteilt, dass

kein Tritiumeinbau an C(9) der 7,8-Dihydrofolsäure (XX) beobachtet werden konnte.) An C(7) wurde jedoch nur eine D-Einbaurate von 80-85% erreicht. Durch Oxydation in methanolischer Iod-Lösung konnte XXII erhalten werden.

Zur Erhöhung des Deuterierungsgrades an C(7) auf ca. 92-95% wurde XXII unter Verwendung von Dideuteriooxid und Natriumdithionit wieder zu XXI reduziert, anschliessend mit deuterierter Base behandelt und zu XXII zurückoxydiert (Schema 5).

Das ^1H -NMR.-Spektrum von 7,9,9-Trideuteriofolsäure (Figur 4) zeigt das Verschwinden der Signale für die Protonen an C(7) und C(9).

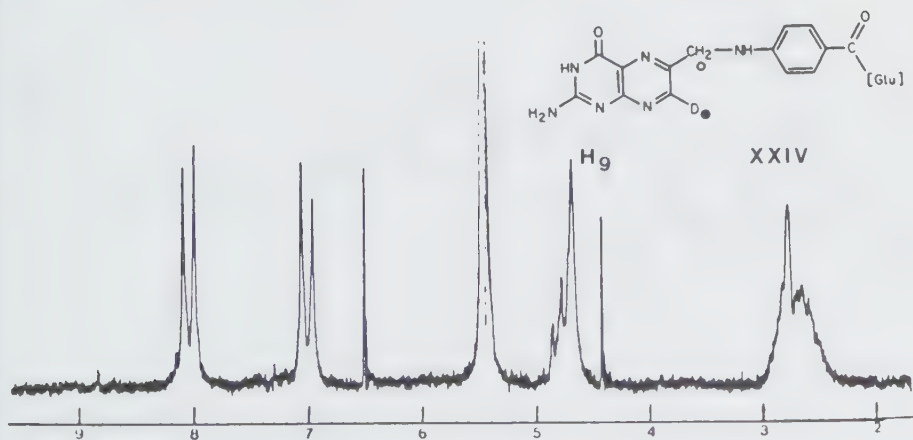
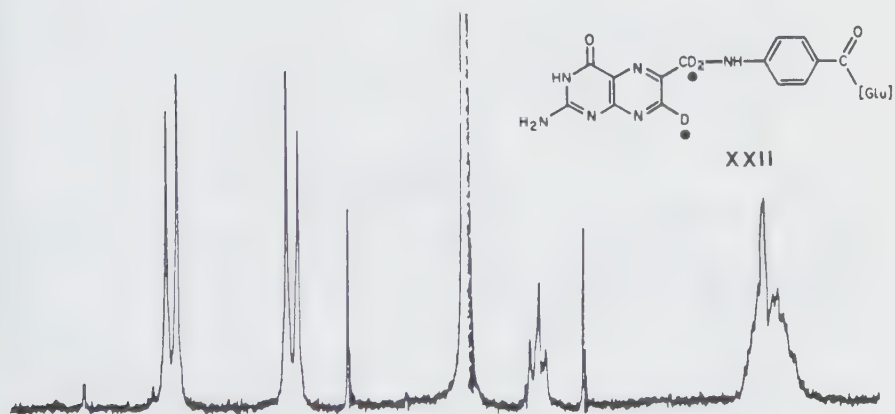
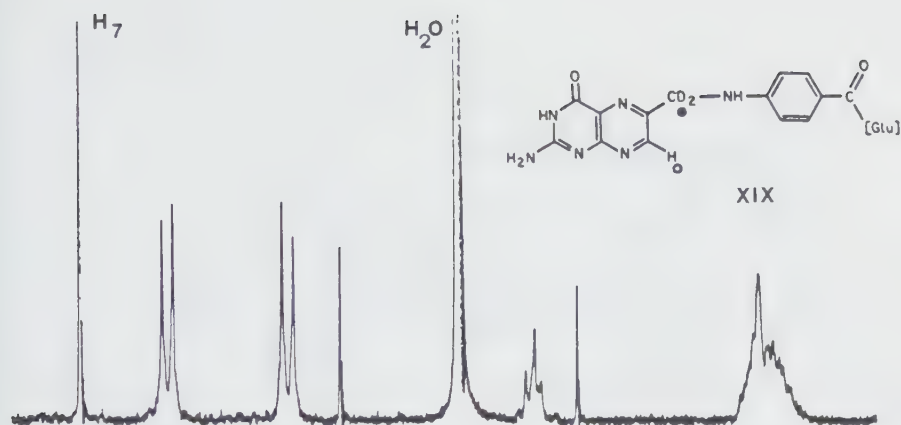
2c. Deuterierung der L-Folsäure an C(7)

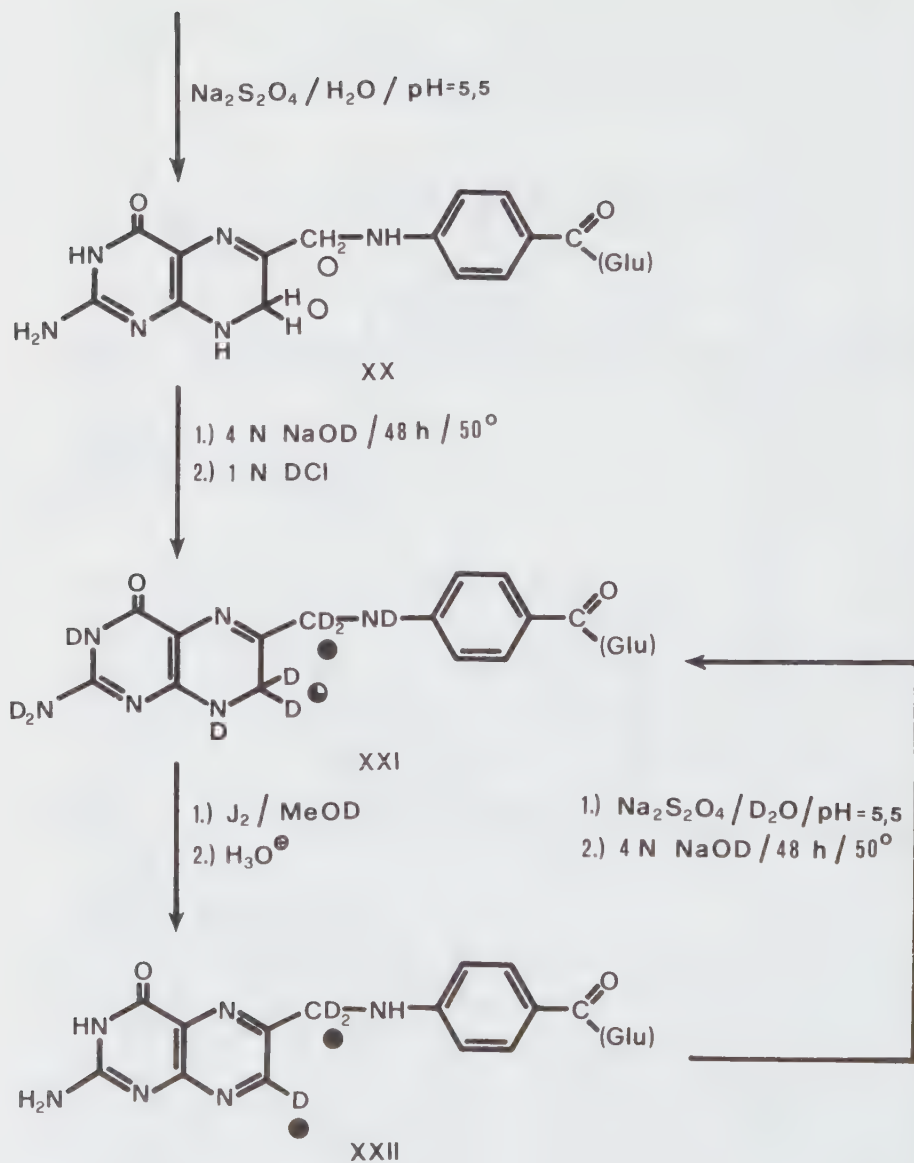
Zur Synthese von 7-Deuterio-L-folsäure (XXIV) wurde von XXII ausgegangen. Wie unter Abschnitt 2a. beschrieben erlaubt die Einführung einer Nitrosogruppe an N(10) den selektiven D/H-Austausch am C(9) (Schema 6).

Nach der Nitrosierung von XXII in 12N HCl wurden die Deuteriumatome an C(9) in 3N NaOH wieder gegen Wasserstoffatome ausgetauscht, während an C(7) kein Austausch erfolgte (Schema 6).

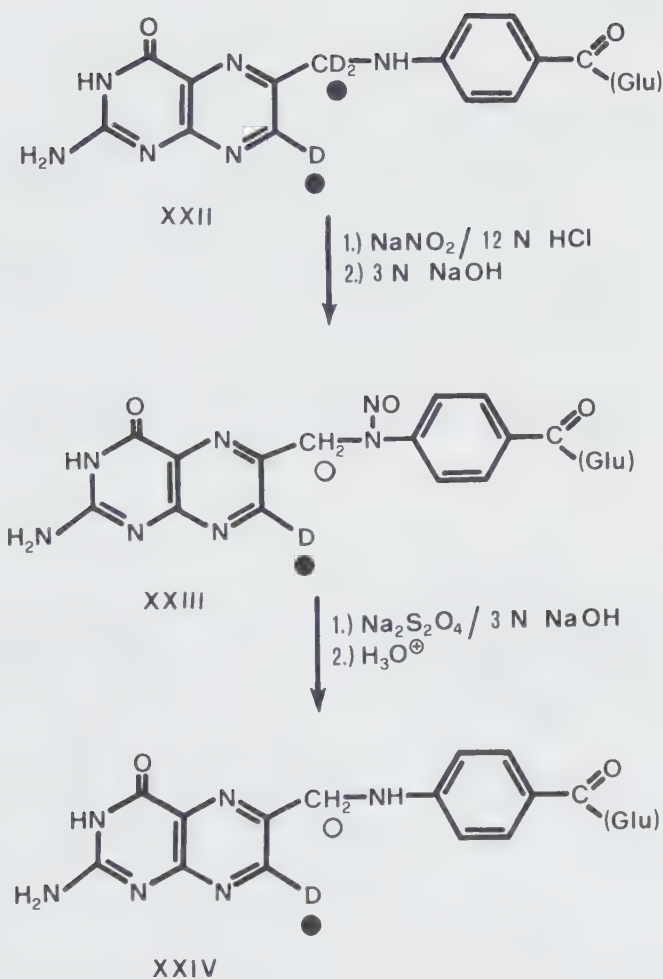
Mit alkalischer Natriumdithionit-Lösung liess sich die Nitrosogruppe, wie im Abschnitt 2a. beschrieben, selektiv entfernen. Das ^1H -NMR.-Spektrum von XXIV (Figur 4) zeigt kein Signal für 2H-C(7), während die 2H-C(9) Protonen bei 4,7 ppm als Singulett erscheinen.

Figur 4: ^1H -NMR.-Spektren (90 MHz) von XIX, XXII, XXIV in 1,8N NaOD





Schema 5

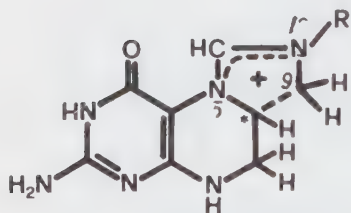


Schema 6

IV. Konformationsanalyse des Gemisches der Diastereomeren 5,10-Methenyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäuren

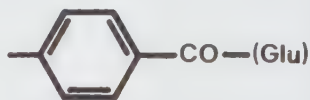
1. Theoretischer Teil

Behandelt man Leucovorin (III) mit verdünnter Säure, so findet ein Ringschluss zwischen N(10) und der Formylgruppe an N(5) statt. Das Produkt dieses Ringschlusses ist 5,10-Methenyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (Anhydrocitraovorumfaktor, Anhydro-Leucovorin) (XIII) mit einer positiven Ladung, die im neugebildeten Imidazolinium-Ring nach Art einer Amidinium-Mesomerie verschiedenen Positionen zugeordnet werden kann.



XIII

R =



* Gemisch der beiden Stereoisomeren

XIII wurde als Chlorid isoliert [64]. Die Verbindung zeichnet sich durch ein charakteristisches UV.-Spektrum mit einem Maximum bei 355 nm aus. Gegenüber dem Leucovorin (III) ist das Maximum um 70 nm zum sichtbaren Bereich hin verschoben, die Substanz ist gelb

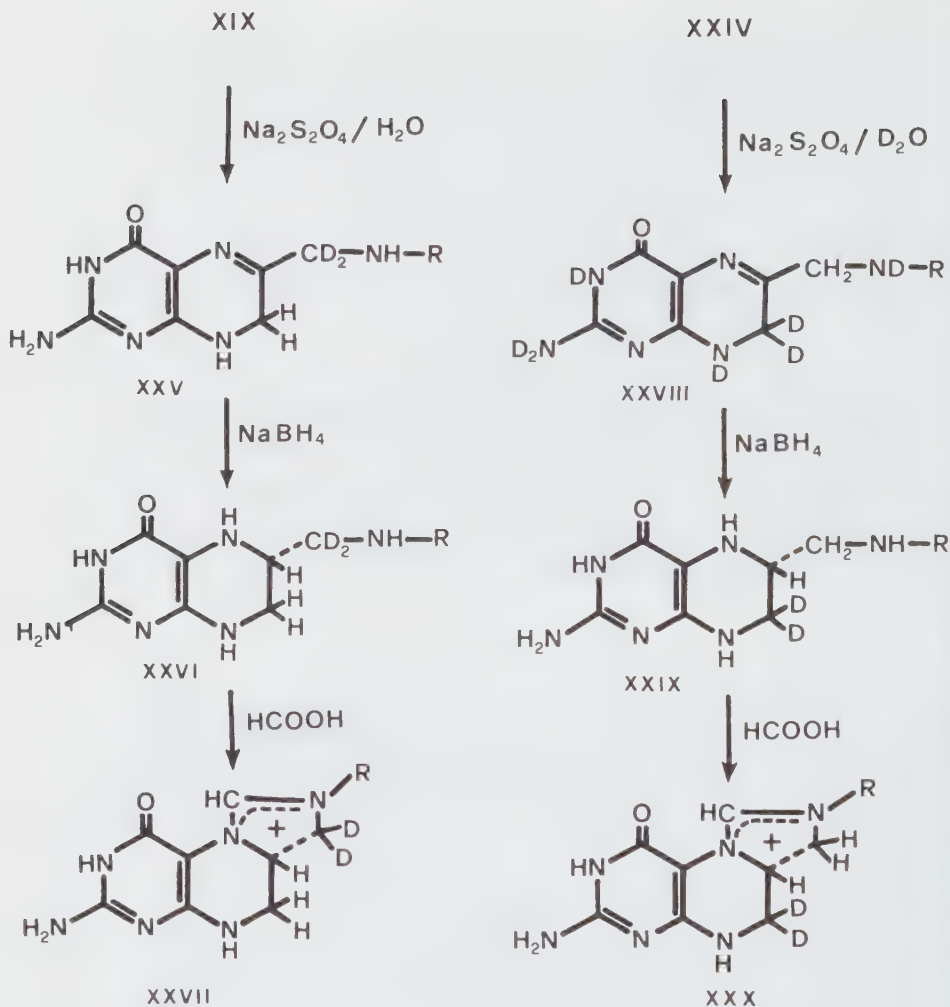
gefärbt. Diese Verschiebung wird auf die Ausbildung einer durchgehenden Konjugation zwischen dem Pterin und dem p-Aminobenzoylkern im Molekül zurückgeführt, welche über die Methin-Brücke zwischen dem N(5) und N(10) zustandekommt. In der Zwischenzeit konnte mit Hilfe einer Röntgenstrukturanalyse die Planarität vom Phenylrest zum N(5)-Atom über die Methin-Brücke bestätigt werden [69].

Eines der beiden Diastereomeren von XIII ist eine Zwischenstufe für die chemische bzw. enzymatische Überführung von 5- oder 10-Formyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure ineinander [14], so dass die Kenntnis der Stereochemie des hydrierten Ringsystems in XIII von zentraler Bedeutung ist.

2. Eigene Arbeiten

Mit der Verfügbarkeit von hochspezifischen Deuterierungsverfahren an C(7) und C(9) (Kapitel III) unternahmen wir den Versuch zur Konformationsanalyse des Diastereomeren-Gemisches von 5,10-Methenyl(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XIII).

Die Synthesen der zur ^1H -NMR.-spektroskopischen Konformationsanalyse vom XIII benötigten deuterierten Verbindungen XXVII und XXX sind im Schema 7 zusammengestellt. Zur Konformationsbestimmung des Tetrahydropyrazin- (in XXVII) und des Imidazolinium-Ringes (in XXX) wurden die Wasserstoffatome in Stellung 9 bzw. 7 vollständig gegen Deuterium ausgetauscht (vgl. exper. Teil). Die 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure-Derivate XXVII und XXX sollten prinzipiell aus einer Mischung von zwei Diastereomeren bestehen, da im Verlauf deren



Scheme 7

Synthesen ein neues chirales Zentrum an C(6) gebildet wird. Wie bei den früher beschriebenen 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäuren [56], konnte kein Unterschied, weder in den ^1H -NMR.- noch in den ^{13}C -NMR.-Spektren für die beiden Diastereomeren beobachtet werden. Daher wurde in Figur 7 willkürlich für XIII die (6R)-Struktur gezeichnet.

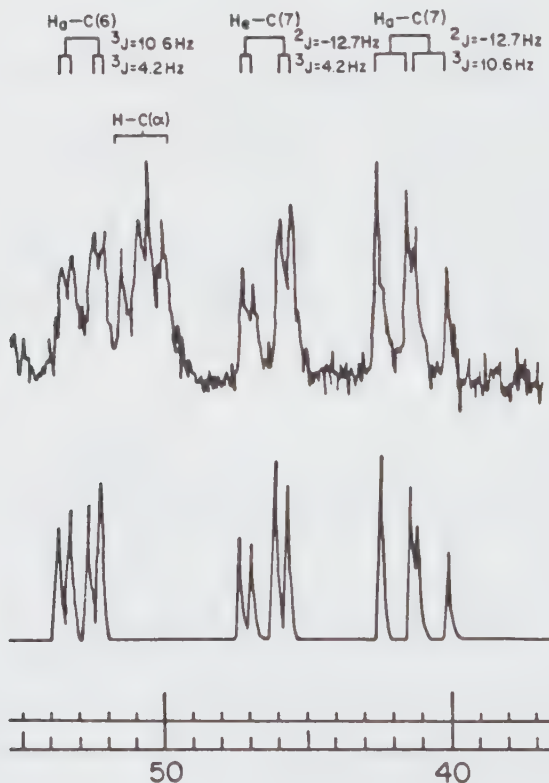
Das zur Konformationsanalyse des Tetrahydropyrazin-Ringes von XXVII aufgenommene ^1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) (Figur 5) ist eindeutig interpretierbar. Es zeigt ein angenähertes AMX-System, aus welchem die chemischen Verschiebungen des C(6) Protons und der beiden C(7) Protonen sowie die zur Konformationsanalyse benötigten geminalen und vicinalen Kopplungskonstanten herausgelesen werden können:

$$J_{\text{AM}} = 4,2 ; \quad J_{\text{MX}} = -12,7 ; \quad J_{\text{AX}} = 10,6 \text{ Hz}$$

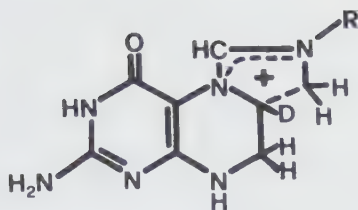
Das mit den obigen Daten simulierte ^1H -NMR.-Spektrum von XXVII ist mit dem experimentellen identisch (Figur 5).

Das ^1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) von XXX konnte für die Konformationsanalyse des Imidazolinium-Ringes nicht eindeutig interpretiert werden. Dagegen liessen sich aus dem 360 MHz-Spektrum (Figur 6), welches für diesen Ring ein ABX-System zeigt, durch eine ABX-Analyse die benötigten Parameter ermitteln. $\text{H}_a\text{-C}(6)$ (A-Teil), $\delta_{\text{V}_0} = 5,30 \text{ ppm}$; $\text{H-C}(9\beta)$ (B-Teil), $\delta_{\text{V}_0} = 5,24 \text{ ppm}$; $\text{H-C}(9\alpha)$ (X-Teil), $\delta_{\text{V}_0} = 4,90 \text{ ppm}$. $J_{\text{AX}} = 9,2$; $J_{\text{BX}} = -11,8$; $J_{\text{AB}} = 11,2 \text{ Hz}$. Die Zuordnung der chemischen Verschiebung des $\text{H}_a\text{-C}(9)$ Protons im AB-Teil erfolgte durch Synthese von 6-Monodeuterio-5,10-methenyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XXXI), diejenige von

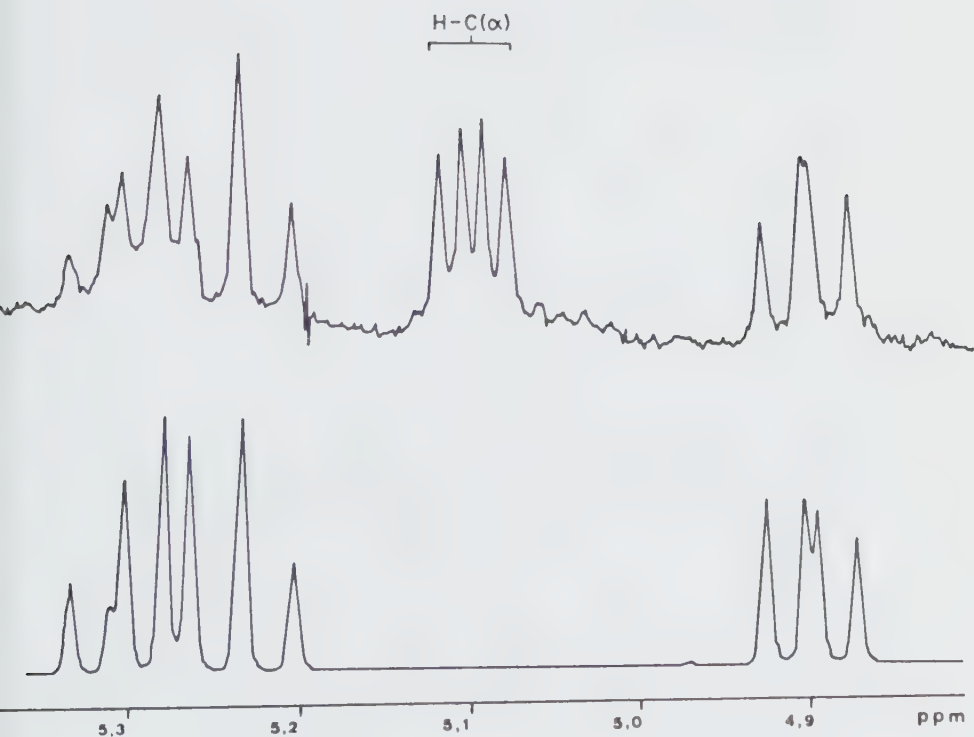
$H_a-C(6)$ konnte mit der Verbindung XXVII (Spektrum in Figur 5) ermittelt werden.



Figur 5: Ausschnitt aus dem 1H -NMR.-Spektrum (100 MHz) von XXVII im Bereich der Tetrahydropyrazinring-Protonen in 0,5N DCl mit dem entsprechenden computersimulierten Spektrum. (Bei dem Signalmultipllett bei 5,08 ppm handelt es sich um das $C(\alpha)$ -Proton der Glutaminsäure-Einheit.)



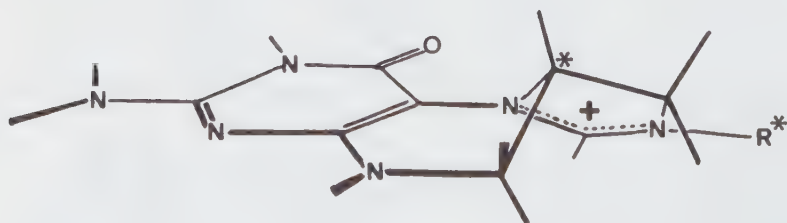
XXXI



Figur 6: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR.-Spektrum (360 MHz) von XXX im Bereich der C(6)- und C(9)-Protonen in 0,5N DCl mit dem entsprechenden computersimulierten Spektrum. (Bei dem Signalmultiplett bei 5,08 ppm handelt es sich um das C(α)-Proton der Glutaminsäure-Einheit.)

Die vicinalen Kopplungskonstanten der H_a -C(6)- und der H_a -C(7) Protonen im Tetrahydropyrazin-Ring von 10,6 Hz belegen deren trans-diaxiale Anordnung, diejenigen von 4,2 Hz die gauche-Konformation von H_a -C(6) und H_e -C(7). Daraus resultiert eine ausgeflachte Halbsessel-Konformation mit pseudo-äquatorialer Anordnung der C(6)-C(9)-Bindung, welche einen Teil des Imidazolinium-Ringes darstellt. Im Imidazolinium-Ring selbst belegt die vicinale Kopplungskonstante von 11,2 Hz für H_a -C(6) und H-C(9 β) deren transoide, diejenige von 9,2 Hz für H_a -C(6) und H-C(9 α) deren cisoider Anordnung. Daraus ergibt sich für den Imidazolinium-Ring eine angenähert planare Struktur.

Wie Figur 6 zeigt, ist das simulierte Spektrum von XXX mit dem experimentellen identisch.



XIII

Figur 7: Räumliche Darstellung der Molekelstruktur von XIII

TEIL C EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Bemerkungen

Die ^1H -NMR.-Spektren wurden auf einem Varian T-60- bzw. HA-100-NMR.-Spektrographen in NaOD, CF_3COOH , DCl und $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (Standard: Tetramethylsilan) aufgenommen; chemische Verschiebungen in ppm; Abkürzungen: s = Singulett, qa = Quartett, m = Multiplett, br = breit, H = Proton(en). Alle NaOD-Proben wurden in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) präpariert. Die beschriebenen deuterierten Verbindungen wiesen eine Deuterium-Einbaurate von 92-95% auf.

1. Herstellung der N(2')-Acetyl-6-azomethinpterine VIII

1.1. N(2')-Acetyl-6-[N-(p-tolyl)-iminomethyl]-pterin (VIIIa). 1 g (3,71 mmol) N(2')-Acetyl-6-formylpterin-dihydrat (VI, $\text{R}^1 = \text{COCH}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$) [34] wird in 400 ml siedendem abs. Äthanol gelöst. Dazu kommen 600 mg (5,57 mmol) p-Toluidin (VIIa). Das Gemisch wird während 30 Min. unter Rückfluss gehalten und anschliessend stehengelassen (5 Std., 5°), wobei das Azomethin auskristallisiert. Abfiltrierung und Trocknung (0,01 Torr, 60° , 5 Std.) ergeben 1090 mg (91,6%) VIIIa. - NMR.⁴⁾ "Hauptprodukt", ca. 86% (60 MHz): 10,08, s, H-C(9); 9,74, s, H-C(7); 7,90 und 7,56, A- und B-Teil eines AA'BB'-

⁴⁾ Die gebildeten Azomethine VIII liegen jeweils in einer syn- und einer anti-Form vor. Die beiden geometrischen Isomeren können u.a. am unterschiedlichen Verhalten der H-C(9), H-C(7) und arom. H in CF_3COOH erkannt werden. Im exper. Teil wird jeweils nur das "Hauptprodukt" charakterisiert.

Systems, J = 8 Hz, 4 aromat. H; 2,58, s, C(4')CH₃; 2,58, s, N(2')COCH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 322 (M⁺,80), 307 (8), 281 (19), 280 (100), 279 (25), 265 (40), 137 (20).

C ₁₆ H ₁₄ N ₆ O ₂	Ber.	C 59,62	H 4,38	N 26,07 %
(322,32)	Gef.	C 59,20	H 4,51	N 25,98 %

1.2. N(2')-Acetyl-6-[N-(1'-acetylamino-phenyl)-imino-methyl]-pterin (VIIIb). Synthese analog zu der

unter 1.1. beschriebenen. Ausbeute 85,7%. - NMR.⁴⁾

"Hauptprodukt", ca. 65% (60 MHz): 10,0, s, H-C(9); 9,80, s, H-C(7); 8,20, s, 4 aromat. H; 3,25, s, C(4')CONCH₃; 2,58, s, N(2')COCH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 365 (M⁺,52), 335 (82), 334 (65), 306 (82), 293 (100), 264 (40).

C ₁₇ H ₁₅ N ₇ O ₃	Ber.	C 55,89	H 4,11	N 26,85 %
(365,33)	Gef.	C 55,34	H 4,24	N 26,72 %

1.3. N(2')-Acetyl-6-[N-(3',6'-dimethyl-phenyl)-imino-methyl]-pterin (VIIIc). Synthese analog zu der

unter 1.1. beschriebenen. Ausbeute 86,3%. - NMR.⁴⁾

"Hauptprodukt", ca. 70% (60 MHz): 9,76, s, H-C(9); 9,66, s, H-C(7); 7,55, s, H-C(2'); 7,46, s, H-C(4') und H-C(5'); 2,58, s, N(2')COCH₃; 2,63, 2,50, 2 × s, 2 × 3H: C(3')CH₃ und C(6')CH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 336 (M⁺,100), 295 (18), 294 (79), 280 (18) 248 (17), 194 (21), 152 (56) 133 (42).

C ₁₇ H ₁₆ N ₆ O ₂	Ber.	C 60,66	H 4,75	N 24,97 %
(336,35)	Gef.	C 60,67	H 4,97	N 24,69 %

1.4. N(2')-Acetyl-6-[N-(1',3',5'-trimethyl-phenyl)-iminomethyl]-pterin (VIId). Synthese analog zu

der unter 1.1. beschriebenen. Ausbeute 88,6%. - NMR.⁴⁾

"Hauptprodukt", ca. 60% (60 MHz): 9,75, s, H-C(9); 9,40,

s, H-C(7); 7,20, s, 2 arom. H; 2,50, 2,48, 2,40, 2,39, 4 × s, 4 × 3H; N(2')COCH₃, C(2')CH₃, C(4')CH₃ und C(6)CH₃.
- MS. [m/e (rel. %)]: 350 (M⁺, 100), 308 (67), 307 (60), 294 (23), 194 (16), 152 (25), 146 (32), 131 (22).

C ₁₈ H ₁₈ N ₆ O ₂	Ber.	C 61,70	H 5,18	N 23,99 %
(350,37)	Gef.	C 61,52	H 5,57	N 23,67 %

1.5. N(2')-Acetyl-6-[N-(1'-methoxycarbonyl-phenyl)-imino-methyl]-pterin (VIIIe). Synthese analog zu der unter 1.1. beschriebenen. Ausbeute 87,5%. - NMR.⁴⁾ "Hauptprodukt", ca. 75% (60 MHz): 9,96, s, H-C(9); 9,76, s, H-C(7); 8,36 und 8,12, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 8 Hz, 4 arom. H; 4,13, s, C(4')COOCH₃; 2,53, s, N(2')COCH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 366 (M⁺, 50), 334 (44), 306 (100), 264 (56).

C ₁₇ H ₁₄ N ₆ O ₄	Ber.	C 55,73	H 3,85	N 22,94 %
(366,33)	Gef.	C 55,20	H 4,21	N 23,23 %

1.6. N-[N(2')-Acetyl-9,10-dehydropteroyl]-L-glutaminsäure-dimethylester (VIIIf). Die Synthese wurde in Anlehnung an [34] ausgeführt: 1 g (3,71 mmol) N(2')-Acetyl-6-formyl-pterin-dihydrat (VI, R¹ = COCH₃ + 2H₂O) [34] wird in 400 ml siedendem abs. Äthanol gelöst. Dazu kommen 1630 mg (5,56 mmol) VIIIf. Das Gemisch wird während 30 Min. unter Rückfluss gehalten, anschliessend unter Vakuum auf ca. 120 ml eingeengt und stehen gelassen (12 Std., 0°), wobei das Produkt auskristallisiert. Abfiltrierung und Trocknung (0,01 Torr, 60°, 5 Std.) ergeben 1480 mg (78,8%) VIIIIf.

1.7. N-[N(2')-Acetyl-9,10-dehydropteroyl]- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-trimethylester (VIIIg). Die Synthese wurde in Anlehnung an [65] ausgeführt, analog zum unter 1.6. beschriebenen Verfahren. Ausbeute 75,3%.

1.8. N-[N(2')-Acetyl-9,10-dehydropteroyl]- γ -L-glutamyl- γ -L-glutamyl-L-glutaminsäure-tetramethylester (VIIIh). Die Synthese wurde in Anlehnung an [66] ausgeführt, analog zum unter 1.6. beschriebenen Verfahren. Ausbeute 71,8%.

2. Herstellung der N(2')-Acetyl-6-aminomethyl-pterine IX

2.1. N(2')-Acetyl-6-[N-(p-tolyl)-aminomethyl]-pterin (IXa). 200 ml 60 proz. Äthanol werden mit Stickstoff gesättigt und auf 60° erwärmt. Dazu kommen 176 mg (4,65 mmol) Natriumborhydrid und unmittelbar darauf 1 g (3,10 mmol) VIIIA. Die Lösung wird 5 Min. bei 60° gerührt und dann weitere 30 mg (0,77 mmol) Natriumborhydrid zugegeben. Nach 10 Min. bei 60° wird auf 22° abgekühlt und langsam Eisessig zugetropft, bis ein pH von 4,5 erreicht ist. Beim Stehenlassen (6 Std., 5°) kristallisiert das Produkt aus. Filtration, Waschen mit 50proz. Äthanol und Trocknung (0,01 Torr, 60°, 6 Std.) ergeben 838,4 mg (83,5%) IXa. - NMR. (100 MHz): 9,18, s, H-C(7); 7,53 und 7,47, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 8 Hz, 4 arom. H; 5,26, s, H₂-C(9); 2,58, s, N(2')COCH₃; 2,45, s, C(4')CH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 324 (M⁺, 80), 322 (34), 281 (14), 280 (34), 265 (12), 171 (20), 120 (24), 108 (80), 106 (100).

C ₁₆ H ₁₆ N ₆ O ₂	Ber.	C 59,25	H 4,97	N 25,91 %
(324,30)	Gef.	C 59,38	H 5,15	N 25,81 %

2.2. N(2')-Acetyl-6-[N-(1'-acetylamino-phenyl)-amino-methyl]-pterin (IXb). Synthese in 30proz. Äthanol; sonst aus VIIIf wie unter 2.1. beschrieben. Ausbeute 80,0%. - NMR. (100 MHz): 9,20, s, H-C(7); 8,09 und 7,91, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 8 Hz, 4 arom. H; 5,34, s, H₂-C(9); 3,25, s, C(4')CONHCH₃; 2,58, s, N(2')COCH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 367 (M⁺, 3), 337 (3), 325 (3), 294 (4), 278 (16), 151 (40), 121 (36), 120 (100).

C ₁₇ H ₁₇ N ₇ O ₃ H ₂ O	Ber.	C 53,51	H 4,67	N 25,45 %
(385,35)	Gef.	C 53,48	H 5,00	N 25,50 %

2.3. N(2')-Acetyl-6-[N-(3',6'-dimethyl-phenyl)-amino-methyl]-pterin (IXc). Synthese in 30proz. Äthanol; sonst aus VIIIf wie unter 2.1. beschrieben. Ausbeute 91,8%. - NMR. (100 MHz): 9,18, s, H-C(7); 7,36, s, 3 arom. H; 5,24, s, H₂-C(9); 2,58, s, N(2')COCH₃; 2,54, 2,40, 2 × s, 2 × 3H, C(3')CH₃ und C(6')CH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 338 (M⁺, 74), 337 (22), 336 (7), 296 (22), 219 (22), 177 (47), 176 (22), 137 (58), 121 (98), 120 (100), 106 (64).

C ₁₇ H ₁₈ N ₆ O ₂	Ber.	C 60,34	H 5,36	N 24,84 %
(383,36)	Gef.	C 59,91	H 5,41	N 24,83 %

2.4. N(2')-Acetyl-6-[N-(1',3',5'-trimethyl-phenyl)-aminomethyl]-pterin (IXd). Synthese in 30proz. Äthanol; sonst wie aus VIIIf unter 2.1. beschrieben. Ausbeute 78,2%. - NMR. (100 MHz): 9,22, s, H-C(7); 7,15, s, 2 arom. H; 5,17, br.s, H₂-C(9); 2,56, s, N(2')COCH₃; 2,52, s, 2 × 3H: C(2')CH₃ und C(6')CH₃; 2,40, s, C(4')CH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 352 (M⁺, 5), 308 (3), 307 (2), 219 (4), 177 (13), 135 (100), 134 (52), 120 (55).

$C_{18}H_{20}N_6O_2$	Ber.	C 61,35	H 5,72	N 23,85 %
(352,39)	Gef.	C 60,84	H 5,79	N 24,64 %

2.5. N(2')-Acetyl-6-[N-(1'-methoxycarbonyl-phenyl)-aminomethyl]-pterin: N(2')-Acetyl-pterinsäure-methylester (IXe). Synthese in 50proz. Äthanol;

sonst aus VIIIe wie unter 2.1. beschrieben. Ausbeute 78,5%. - NMR. (100 MHz): 9,20, s, H-C(7); 8,33 und 7,87, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 8 Hz, 4 arom. H; 5,34, s, H₂-C(9); 4,13, s, C(4')COOCH₃; 2,58, s, N(2')COCH₃. - MS. [m/e (rel. %)] : 368 (M⁺, 53), 326 (16), 264 (14), 219 (15), 204 (13), 177 (42), 176 (46), 151 (50), 120 (100).

$C_{17}H_{16}N_6O_4$	Ber.	C 55,43	H 4,38	N 22,82 %
(368,35)	Gef.	C 55,79	H 4,32	N 22,84 %

2.6. Die Synthesen von IXf, IXg und IXh wurden nach [34], [65], [66] ausgeführt.

3. Herstellung der 6-Aminomethyl-pterine X

3.1. 6-[N-(p-Tolyl)-aminomethyl]-pterin (Xa). 100 ml 0,1N NaOH werden mit sauerstofffreiem Stickstoff gesättigt und auf 70° erwärmt. Dazu kommt 1 g (3,08 mmol) IXa. Die Lösung wird während 30 Min. bei 70° gerührt, anschliessend auf 22° abgekühlt und das pH mittels Eisessig auf 4,5 gebracht, wobei das Produkt ausfällt. Abfiltrierung, Waschen mit Eiswasser, Äthanol, Äther und Trocknung (0,01 Torr, 60°, 6 Std.) ergeben 769 mg (88,2%) Xa. - Für die analytischen Daten vgl. [67].

3.2. 6-[N-(1'-Acetylamino-phenyl)-aminomethyl]-pterin
(Xb). Synthese aus IXb wie unter 3.1. beschrieben.

Ausbeute 92,1%. - NMR. (60 MHz): 8,93, s, H-C(7); 8,09 und 7,91, A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, J = 8 Hz, 4 arom. H; 5,23, s, H₂-C(9); 3,35, s, C(4')CONHCH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 325 (M⁺, 1), 296 (1), 196 (3) 177 (7), 150 (70), 149 (22), 121 (22), 120 (100), 92 (90).

C ₁₅ H ₁₅ N ₇ O ₂ , 2H ₂ O	Ber.	C 49,82	H 5,26	N 27,14 %
	Gef.	C 50,07	H 5,70	N 28,02 %

3.3. 6-[N-(3',6'-Dimethyl-phenyl)-aminomethyl]-pterin
(Xc). Synthese aus IXc wie unter 3.1. beschrieben.

Ausbeute 89,6%. - NMR (60 MHz): 8,91, s, H-C(7); 7,33, s, 3 arom. H; 5,11, br.s, H₂-C(9); 2,51, 2,38, 2 × s, 2 × 3H: C(3')CH₃ und C(6')CH₃. - MS [m/e (rel. %)]: 296 (M⁺, 55), 271 (6), 177 (26), 176 (26), 135 (27), 121 (96), 120 (100), 106 (60).

C ₁₅ H ₁₆ N ₆ O	Ber.	C 60,79	H 5,44	N 28,36 %
(296,33)	Gef.	C 60,34	H 5,43	N 28,49 %

3.4. 6-[N-(1',3',5'-Trimethyl-phenyl)-aminomethyl]-pterin (Xd). Synthese aus IXd wie unter 3.1. beschrieben. Ausbeute 88,8%. - NMR. (60 MHz): 9,03, s, H-C(7); 7,19, s, 2 arom. H; 5,13, br.s, H₂-C(9); 2,58, s, 2 × 3H: C(2')CH₃ und C(6')CH₃; 2,43, s, C(4')CH₃. - MS. [m/e (rel. %)]: 310 (M⁺, 20), 308 (8), 296 (4), 294 (4), 177 (38), 135 (100), 134 (95), 120 (77), 106 (11).

C ₁₆ H ₁₈ N ₆ O	Ber.	C 61,92	H 5,85	N 27,08 %
(310,35)	Gef.	C 61,61	H 5,96	N 27,40 %

3.5. 6-[N-(p-Carboxyphenyl)-aminomethyl]-pterin:

Pteroinsäure (Xe). Synthese: Für 1 g (2,71 mmol) IXe in 200 ml 0,1N NaOH; sonst wie unter 3.1. beschrieben. Ausbeute 73,6%. - MS. [m/e (rel. %)]: 312 (M^+ , <1), 268 (7), 177 (7), 176 (7), 137 (20), 120 (26), 98 (87), 45 (100). - Für die übrigen analytischen Daten vgl. [67].

3.6. Die Synthesen von Xf, Xg und Xh wurden nach [34], [65], [66] ausgeführt.

4. 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (XII). Nach den von uns modifizierten Methoden [48]: Unter Rühren und Einleiten von N_2 wurden 4,0 g Ascorbinsäure in 100 ml H_2O gelöst, und mit 2N NaOH wurde das pH auf 4,5 eingestellt (22°). Nach Zugabe von 6,0 g (34,4 mmol) $Na_2S_2O_4$ wurde dieses Gemisch tropfenweise mit 2,0 g (4,53 mmol) Folsäure, gelöst in 10 ml 1N NaOH, versetzt. Dann wurde mit Hilfe von Ascorbinsäure das pH auf 4,0 eingestellt, wobei das Produkt ausfiel. Man rührte weitere 10 Min., liess auf 10° abkühlen, stellte mit 1N HCl das pH auf 3,0 ein und saugte unmittelbar danach durch eine Glasfritte G3 ab. Nach Waschen des Rückstandes mit H_2O (5°) und Trocknen (50°, 6 Std. 0,01 Torr) erhielt man 1,65 g (3,72 mmol) 7,8-Dihydrofolsäure in einer Ausbeute von 82%. Diese wurde in einem Handschuhkasten mit N_2 Atmosphäre in 30 ml entgastem H_2O aufgeschlemmt. Zugabe von 350 mg (9,25 mmol) $NaBH_4$ ergab eine leicht gelbe, klare Lösung. Man liess 6 Std. stehen, gab dann 100 mg (2,64 mmol) $NaBH_4$ zu und liess weitere 12 Std. stehen. Die Lösung wurde mit Tierkohle versetzt, 30 Min. gerührt und abfiltriert. Unter Rühren wurde das pH des Filtrats mit 1N HCl auf 3,4 eingestellt, wobei das farblose Produkt ausfiel. Dieses

wurde immer noch unter N_2 abzentrifugiert, mit H_2O (5°) gewaschen und so schnell als möglich getrocknet (40° , 6 Std., 0,01 Torr). Man erhielt 1,3 g Tetrahydrofolsäure in einer Ausbeute von 75%.

5. 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure "Leucovorin"

(III). In einem Handschuhkasten mit N_2 als Schutzgas wurden bei Raumtemperatur 1,2 g (2,60 mmol) Tetrahydro-L-Folsäure in 10 ml Dimethyl-Sulfoxid gelöst. Dazu kamen 2 ml Pyridin. Unter Rühren wurden 14 ml Ameisensäure-methylester zugetropft. Die homogene, leicht gelbliche Lösung liess man unter Lichtausschluss 24 Std. stehen. Unter Rühren wurden 6 ml Ameisensäure-methylester zugetropft, was nach weiteren 24 Std. wiederholt wurde. Man liess nochmals 24 Std. stehen, gab dann ausserhalb des Handschuhkastens 100 ml 99proz. Äthanol zu, behandelte mit Tierkohle (22°) und filtrierte über Hyflo ab. Das Produkt wurde mit 500 ml Äther unter Rühren aus dem Filtrat ausgefällt. Abzentrifugieren, Waschen mit Chloroform und Äther und Trocknen ergab 1,07 g (84%) Rohprodukt, welches über eine Cellulose-Säule gereinigt wurde:

Zu einer Säule (30 cm $\times$ 3,3 cm) wurde Whatman Cellulose CF11 trocken eingefüllt und mit 5proz. Ammoniaklösung und dann mit H_2O bis pH neutral gewaschen. 200 mg (0,42 mmol) rohes Leucovorin (III) wurden in 5 ml 0,1N NaOH gelöst, aufgetragen und mit H_2O eluiert. Die gesamte Fraktion welche III enthielt (DC.-Kontrolle), wurde am Wasserstrahlvakuum auf ca. 5 ml eingengt (30°). Dazu wurden 100 mg $CaCl_2$ gegeben. Die klare Lösung wurde unter Rühren mit 50 ml abs. Alkohol versetzt, wobei das farblose Ca-Salz von Leucovorin ausfiel, welches abzentrifugiert, mit Äthanol gewaschen und getrocknet wurde (50° ,

6 Std., 0,01 Torr). Ausbeute 168 mg (58% bezogen auf Tetrahydrofolsäure).

$^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, 0,1N NaOD): 9,02 (s, $\text{HCO-N}(5)$), 8,05 und 7,10 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 8$ Hz, 4 aromat. H); 4,75 ($\text{H-C}(\alpha)$); 4,0-3,5 (m, $\text{H-C}(6)$, $2\text{H-C}(7)$ und $2\text{H-C}(9)$); 2,9-2,3 (m, $2\text{H-C}(\beta)$ und $2\text{H-C}(\gamma)$).

DC.: RF = 0,71 (Cellulose); Lsg.: 3,0% (W/V) NH_4Cl und 0,5% (V/V) 2-mercaptoäthanol.

$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_7$ Ca $5\text{H}_2\text{O}$	Ber.	C 39,93	H 5,15	N 16,29 %
(601,56)	Gef.	C 40,08	H 4,89	N 16,28 %

6. N(10)-Nitroso-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XV). Die Synthese wurde mit Herrn Ganguly durchgeführt und wird demnächst in Helvetica chimica Acta veröffentlicht.

7. N(10)-Nitroso-Leucovorin (XVI) und Leucovorin (III),
"Schema 3". Die Synthese wurde mit Herrn Ganguly durchgeführt und wird demnächst in Helvetica chimica Acta veröffentlicht.

8. N(10)-Nitroso-folsäure (XIV). Die Verbindung wurde nach [59] dargestellt. - $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) (Figur 3): 8,75 (d, $J = 8$ Hz, $\text{HN-C}(\alpha)$); 8,68 (s, $\text{H-C}(7)$); 8,08 und 7,94 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9$ Hz, 4 aromat. H); 7,50-7,15 (br.s, $2\text{H-N}(2')$); 5,50 (s, $2\text{H-C}(9)$); 4,64-4,32 (m, $\text{H-C}(\alpha)$); 2,55-1,90 (m, $2\text{H-C}(\beta)$ und $2\text{H-C}(\gamma)$).

9. 9,9-Dideuterio-N(10)-nitroso-folsäure (XVIII). 1 g (2,12 mmol) XIV wurde in 10 ml 2N NaOD unter N₂ gelöst und 24 Std. (30°) stehen gelassen. Nach Zugabe von 15 ml D₂O wurde unter Rühren 2N DCl bis zu einem pH von 3 zugegeben. Der Niederschlag XIV wurde abgenutscht, mit D₂O gewaschen und getrocknet (0,01 Torr, 40°, 12 Std.). Zur Erreichung der geforderten Deuterium-Einbaurate wurde die obige Vorschrift einmal wiederholt. Ausbeute: 850 mg (84%) XVIII. - ¹H-NMR. (100 MHz, (CD₃)₂SO) (Figur 3): Analoges Spektrum wie unter 8. beschrieben, jedoch ohne die HN- und 2H-C(9)-Resonanzen. Das H-C(α)-Proton der Glutaminsäureeinheit absorbiert als qa-artiges m (Teil eines ABX-Systems).

10. 9,9-Dideuterio-folsäure (XIX). 1 g (2,10 mmol) XVIII wurde in 15 ml 3N NaOD in einem Handschuhkasten (Inertgas: N₂) gelöst. Dazu kam 1 g (5,74 mmol) Na₂S₂O₄. Die Lösung wurde 72 Std., 22°, stehen gelassen, unter Luftzutritt filtriert, mit 40 ml H₂O verdünnt und auf 0° gekühlt. Durch Zugabe von 3N HCl bis pH 2,8 (0°) fiel XIX aus. Es wurde sofort abzentrifugiert (0°), mit H₂O gewaschen, getrocknet (0,01 Torr, 40°, 12 Std.) und anschließend in 12 ml 5N NaOH gelöst, mit Aktivkohle behandelt, abfiltriert und stehen gelassen (48 Std., -5°). Das gebildete Natriumsalz von XIX wurde bei 0° abzentrifugiert, in 30 ml H₂O gelöst (22°), das pH mittels 1N HCl auf 2,8 gebracht, wobei das Produkt XIX ausfiel. Abzentrifugieren, Waschen mit H₂O und Trocknung (0,01 Torr, 40°, 12 Std.) ergaben 570 mg (61%) XIX. - ¹H-NMR.: Entspricht dem in [68] aufgeführten Spektrum, jedoch ohne Pik 2H-C(9); (100 MHz; (CD₃)₂SO); 9,03 (s, H-C(7)); 8,52 (d, J = 8 Hz, HN-C(α)); 8,04 und 7,02 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Sy-

stems, $J = 9$ Hz, 4 arom. H); 7,34 (br.s, 2H-N(2')); 4,90-4,60 (m, H-C(α)); 2,80-2,20 (m, 2H-C(β) und 2H-C(γ)).

11. 7,8-Dihydrofolsäure (XX). Die Verbindung wurde nach [42,43] dargestellt. - $^1\text{H-NMR}$.: Entspricht den in [48] und [68] beschriebenen Spektren.

12. 7,7,9,9-Tetradeuterio-7,8-dihydrofolsäure (XXI).⁵⁾
1 g (2,25 mmol) XX wurde in 5 ml 4N NaOD gelöst und 24 Std. bei 50° unter Lichtausschluss gerührt, mit 20 ml D₂O verdünnt (22°) und das pH mit 1N DCl auf pH 3 gebracht. Die voluminöse Fällung XXI wurde abzentrifugiert und getrocknet (0,01 Torr, 40°, 12 Std.). Nach einmaliger Wiederholung obiger Vorschrift wurde eine D-Einbaurrate in Stellung 7 von 85% beobachtet (vgl. [48] und Schema 5). Waschen mit H₂O und Trocknung (0,01 Torr, 40°, 12 Std.) ergaben 820 mg (80%) XXI. - $^1\text{H-NMR}$.: Analoge Spektren wie unter [48] und [68] beschrieben, jedoch ohne Pik 2H-C(9) und zu 15% Pik 2H-C(7).

13. 7,9,9-Trideuterio-folsäure (XXII). Unter Einleitung von Stickstoff und Rühren wurde 1 g (2,21 mmol) XXI in 40 ml D₂O aufgeschlämmt und durch tropfenweise Zugabe von 1N NaOD in Lösung gebracht. Danach wurden 570 mg (2,24 mmol) Jod, gelöst in 10 ml Monodeuteromethanol,

⁵⁾ Die Darstellung von XXI erfolgte in einem Handschuhkasten (Inertgas: N₂).

langsam zugetropft, wobei das pH im Bereich zwischen 7 bis 9 gehalten wurde (Korrektur mit 1N NaOD). Anschliessend wurde auf 40° erwärmt, Aktivkohle zugegeben und 15 Min. gerührt. Nach Filtration wurde das pH bei 22° mit 2N HCl auf 2,8 gebracht, wobei XXII ausfiel. Das Produkt wurde abzentrifugiert und mit H₂O und Methanol gewaschen. Dieses wurde in 400 ml H₂O unter Einleitung von N₂ aufgeschlämmt und die Reaktionsmischung auf 80° gebracht. Durch tropfenweise Zugabe von 0,1N NaOH wurde bei einem pH von 10 eine Lösung erreicht. Dazu kamen 150 mg Aktivkohle. Nach 15 Min. Rühren bei 80° wurde heiss filtriert und anschliessend das Filtrat bei 90° durch Zugabe von 12N HCl auf pH 3 gebracht. Stehenlassen (22°, 24 Std.), Abzentrifugieren, Waschen mit H₂O und Trocknung (0,01 Torr, 40°, 6 Std.) ergaben 730 mg (73,5%) kristallines XXII. (D-C(7)-Einbaurate: 80-85%).

Um die gewünschte D-Einbaurate zu erhalten, wurde XXII nochmals nach [42] unter Verwendung der entsprechenden deuterierten Reagenzien, jedoch ohne Verwendung von Ascorbinsäure, nach [48] im Handschuhkasten (Inertgas: N₂) zu XXI reduziert, wie unter 12. beschrieben mit 4N NaOD behandelt und anschliessend mit Jod, wie oben beschrieben, zu XXII oxydiert (vgl. dazu Schema 5). Nochmalige Wiederholung des Reduktions-Oxydations-Zyklus ergab in Stellung 7 einen Deuteriumgehalt von 92-95%. - ¹H-NMR.: Analoge Spektren wie unter 10. aufgeführt, jedoch ohne Pik für H-C(7).

14. 7-Monodeuterio-N(10)-nitroso-folsäure (XXIII). XXII wurde nach [59] in Stellung 10 nitrosiert. Der D/H-Austausch an C(9) wurde wie unter 9. beschrieben ausgeführt, jedoch unter Verwendung von 2N NaOH bei 40°. - ¹H-NMR.: Wie unter 8. beschrieben, jedoch ohne Pik für H-C(7).

15. 7-Monodeuterio-folsäure (XXIV). Darstellung wie unter 10. beschrieben und unter Verwendung von 3N NaOH. - $^1\text{H-NMR}$.: Entspricht dem in [68] und unter 10. aufgeführten Spektren, jedoch ohne Pik für H-C(7).

16. 9,9-Dideuterio-7,8-dihydro-L-folsäure (XXV) und 9,9-Dideuterio-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XXVI). Die Verbindungen wurden nach [57] hergestellt.

17. 7,7-Dideuterio-7,8-dihydro-L-folsäure (XXXVIII) und 7,7-Dideuterio-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XXIX). Die Verbindungen wurden nach [57] hergestellt, jedoch unter Verwendung des in 7-Stellung monodeutერიerten Eduktes XXIV. Für die Synthese von XXVIII wurden die entsprechenden deuterierten Reagenzien verwendet und in einem Handschuhkasten (Inertgas: N_2) gearbeitet. Damit entfiel die Zugabe von Ascorbinsäure.

18. 9,9-Dideuterio-5,10-methenyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XXVII). Im Handschuhkasten (Inertgas: N_2) wurden 200 mg (0,44 mmol) XXVI in 5 ml Ameisensäure gelöst und stehen gelassen (22° , 24 Std.). Unter Luftzutritt wurde die Lösung in eine Mischung von 40 ml Äther, 3 ml Äthanol und 200 mg 12N HCl bei 5° unter Rühren zugetropft. Der Niederschlag XXVII wurde abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und getrocknet (22° , 0,01 Torr, 4 Std.). Anschliessend wurde XXVII in 2 ml 2N HCl bei 22° gelöst und bei 5° stehen gelassen, wobei XXVII ausfiel. Abzentrifugieren, Waschen mit wenig 2N HCl (5°) und Um-

kristallisation aus 1N HCl (ca. 60°) ergab das Chloridsalz von XXVII in einer Ausbeute von 64%. Die analytischen Daten stimmen mit den in [18] beschriebenen überein. - $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, 0,5N DCl) (Figur 5): 9,95 (s, $\text{H}-\overset{+}{\text{C}}[\text{N}(5), \text{N}(10)]$); 8,33 und 7,94 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9$ Hz, 4 arom. H); 5,30 ($\text{H}_a\text{-C}(6)$); 5,08 ($\text{H-C}(\alpha)$); 4,65 ($\text{H}_e\text{-C}(7)$); 4,12 ($\text{H}_a\text{-C}(7)$); 3,15-2,50 (m, $2\text{H-C}(\beta)$ und $2\text{H-C}(\gamma)$).

19. 7,7-Dideuterio-5,10-methenyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XXX). Die Verbindung wurde wie unter 18. beschrieben hergestellt, jedoch ausgehend von XXIX. - $^1\text{H-NMR}$. (360 MHz, 0,5N DCl) (Figur 6): 9,95 (s, $\text{H}-\overset{+}{\text{C}}[\text{N}(5), \text{N}(10)]$); 8,33 und 7,94 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9$ Hz, 4 arom. H); 5,30 ($\text{H}_a\text{-C}(6)$); 5,24 ($\text{H-C}(9\beta)$); 5,08 ($\text{H-C}(\alpha)$); 4,90 ($\text{H-C}(9\beta)$); 3,15-2,50 (m, $2\text{H-C}(\beta)$ und $2\text{H-C}(\gamma)$).

20. 6-Monodeuterio-5,10-methenyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (XXXI). Ausgehend von L-Folsäure wurde 7,8-Dihydro-L-folsäure nach [42] hergestellt. Nach [57], jedoch unter Verwendung von NaBD_4 und den entsprechenden deuterierten Lösungsmitteln, wurde 6-Monodeuterio-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure erhalten. Wie unter 18. beschrieben wurde XXXI synthetisiert. - $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, 0,5N DCl): 9,95 (s, $\text{H}-\overset{+}{\text{C}}[\text{N}(5), \text{N}(10)]$); 8,33 und 7,94 (A- und B-Teil eines AA'BB'-Systems, $J = 9$ Hz, 4 arom. H); 5,23 und 4,88 (A- und B-Teil eines AB-Systems, $J = 11,8$ Hz, $2\text{H-C}(9)$); 5,08 ($\text{H-C}(\alpha)$); 4,64 und 4,13 (A- und B-Teil eines AB-Systems, $J = 12,7$ Hz, $2\text{H-C}(7)$); 3,15-2,50 (m, $2\text{H-C}(\beta)$ und $2\text{H-C}(\gamma)$).

TEIL D ZUSAMMENFASSUNG

- a) Eine allgemeine Methode für die Synthese von Folsäure, Folsäurekonjugaten und Folsäureanalogen wurde entwickelt. Die Produkte wurden in hoher Ausbeute und frei von 7-Isomeren erhalten.
- b) Eine direkte Synthese von Leucovorin (5-Formyl-(6R oder S)-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-glutaminsäure) wurde beschrieben. Die Formylierung von 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure mit Ameisensäuremethylester in Dimethylsulfoxid führt direkt zum gewünschten Produkt in guter Ausbeute.
- c) Die regiospezifische Deuterierung von Folsäure mit NaOD am C(9) wurde durch Einführung einer Nitrosogruppe am N(10) erreicht. Davon ausgehend wurden auch die 7,9,9-Trideuteriofolsäure und die 7-Deuteriofolsäure dargestellt.
- d) Die Konformationsanalyse der 5,10-methenyl-(6R oder S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure wurde mit Hilfe der 9,9- und der 7,7-Dideuterio-5,10-methenyl-(6R oder S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure durchgeführt. Die Konformation des Tetrahydropyrazinringes ist vergleichbar mit derjenigen in der Tetrahydrofolsäure, der Halbsessel mit pseudoäquatorialer C(6), C(9)-Bindung ist aber stärker ausgeprägt.

TEIL E LITERATURVERZEICHNIS

- [1] I.H. Rosenberg & H.A. Godwin, Gastroenterology 60, 445 (1971).
- [2] C.M. Baugh & C.L. Krumdieck, Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 7 (1971).
- [3] R.W. Erbe, N. Engl. J. Med. 293, 753 (1975).
- [4] A.G. Hoogan & E.M. Parrott, J. biol. Chemistry 132, 507 (1940).
- [5] J.J. Pfiffner, S.B. Binkley, E.S. Bloom, R.A. Brown, O.D. Bird, A.D. Emmett, A.G. Hoogan & B.L. O'Dell, Science 97, 404 (1943).
- [6] E.E. Snell & W.H. Peterson, J. Bakteriologie. 39, 273 (1940).
- [7] H.K. Mitchell, E.E. Snell & R.J. Williams, J. Amer. chem. Soc. 63, 2284 (1941).
- [8] R.B. Angier, J.H. Boothe, B.L. Hutchings, J.H. Mowat, J. Semb, E.L.R. Stokstad, Y. Subba-Row, C.W. Waller, D.B. Cosulich, M.J. Fahrenbach, M.E. Hultquist, E. Kuh, E.H. Northey, D.R. Seeger, J.P. Sickels & J.M. Smith, Jr., Science 103, 667 (1946).
- [9] J.H. Mowat, J.H. Boothe, B.L. Hutchings, E.L.R. Stokstad, C.W. Waller, R.B. Angier, J. Semb, D.B. Cosulich & Y. Subba-Row, J. Amer. chem. Soc. 70, 14 (1948).
- [10] C.W. Waller, B.L. Hutchings, J.H. Mowat, E.L.R. Stokstad, J.H. Boothe, R.B. Angier, J. Semb, Y. Subba-Row, D.B. Cosulich, M.J. Fahrenbach, M.E. Hultquist, E. Kuh, E.H. Northey, D.R. Seeger, J.P. Sickels & J.M. Smith, Jr., J. Amer. chem. Soc. 70, 19 (1948).

- [11] M.E. Hultquist, E. Kuh, D.B. Cosulich, M.J. Fahrenbach, E.H. Northey, D.R. Seeger, J.P. Sickels, J.M. Smith, Jr., R.B. Angier, J.H. Boothe, B.L. Hutchings, J.H. Mowat, J. Semb, E.L.R. Stokstad, Y. Subba-Row & C.W. Waller, J. Amer. chem. Soc. 70, 23 (1948).
- [12] R.B. Angier, E.L.R. Stokstad, J.H. Mowat, B.L. Hutchings, J.H. Boothe, C.W. Waller, J. Semb, Y. Subba-Row, D.B. Cosulich, M.J. Fahrenbach, M.E. Hultquist, E. Kuh, E.H. Northey, D.R. Seeger, J.P. Sickels & J.M. Smith, Jr., J. Amer. chem. Soc. 70, 25 (1948).
- [13] J.H. Boothe, C.W. Waller, E.L.R. Stokstad, B.L. Hutchings, J.H. Mowat, R.B. Angier, J. Semb, Y. Subba-Row, D.B. Cosulich, M.J. Fahrenbach, M.E. Hultquist, E. Kuh, E.H. Northey, D.R. Seeger, J.P. Sickels & J.M. Smith, Jr., J. Amer. chem. Soc. 70, 27 (1948).
- [14] R.L. Blakley, "The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines", Wiley, New York 1969.
- [15] H.E. Sauberlich & C.A. Baumann, J. biol. Chemistry 176, 165 (1948).
- [16] W.M. Hryniuk, J. Clin. Invest. 48, 2140 (1969); M.R. Vogler, Cancer 25, 894 (1971).
- [17] G.R. Burgio & F. Severi, Med. Klin. 66, 976 (1971).
- [18] D.B. Cosulich, B. Roth, J.M. Smith, Jr., M.E. Hultquist & R.P. Parker, J. Amer. chem. Soc. 74, 3252 (1952).
- [19] A. Pohland, E.H. Flynn, R.G. Jones & W. Shive, J. Amer. chem. Soc. 73, 3247 (1951).
- [20] W. Allen, R.L. Pasternak & W. Seaman, J. Amer. chem. Soc. 74, 3264 (1952).
- [21] L. Wills, Brit. med. J. I, 1059 (1931).

- [22] L. Wills & A. Stewart, Brit. J. Exptl. pathol. 16, 444 (1935).
- [23] H.K. Mitchell, E.E. Snell & R.J. Williams, J. Amer. chem. Soc. 66, 267 (1944).
- [24] E.L. Rickes, L. Chaut & J.C. Keresztesy, J. Amer. chem. Soc. 69, 2749 (1947).
- [25] S. Denko, J. Appl. physiol. 3, 559 (1951).
- [26] G.H. Spray & L.J. Witts, Clin. Sci. 11, 273 (1952).
- [27] S.L. Clark, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 82, 25 (1953).
- [28] M.E. Swendseid, O.D. Bird, R.A. Brown & F.H. Bethell, J. Lab. Clin. Med. 32, 23 (1947).
- [29] C.M. Baugh, J.C. Stevens & C.L. Krumdieck, Biochem. biophys. Acta 212, 116 (1970).
- [30] A.V. Hofbrand & T.J. Peters, Biochem. biophys. Acta 192, 479 (1969).
- [31] G. Johns, S. Sperti & A.S.V. Burgen, J. Clin. Invest. 40, 1684 (1961).
- [32] H. Watanabe, Dissertation University of McGill, Montreal 1962.
- [33] P. Karrer & R. Schwyzer, Helv. 31, 777 (1948).
- [34] J.H. Bieri & M. Viscontini, Helv. 56, 2905 (1973).
- [35] J.H. Boothe, J.H. Mowatt, B.L. Hutchings, R.B. Angier, C.W. Waller, E.L.R. Stokstad, J. Semb, A.L. Gazzola & Y. Subba-Row, J. Amer. chem. Soc. 70, 1099 (1948).
- [36] J.H. Boothe, J. Semb, C.W. Waller, R.B. Angier, J.H. Mowatt, B.L. Hutchings, E.L.R. Stokstad & Y. Subba-Row, J. Amer. chem. Soc. 71, 2304 (1949).
- [37] E.C. Taylor & K. Lenard, J. Amer. chem. Soc. 90, 2424 (1968).
- [38] H.A. Godwin, I.H. Rosenberg, C.R. Perenz, P.M. Jacobs & J. Meienhofer, J. biol. Chemistry 247, 2266 (1972).

- [39] C.L. Krumdieck & C.M. Baugh, *Biochemistry* 8, 1568 (1969);
J. Meienhofer, P.M. Jacobs, H.A. Godwin, I.H. Rosenberg & J. Rosenberg, *J. org. Chemistry* 35, 4137 (1970).
- [40] E. Khalifa, P.K. Sengupta, J.H. Bieri & M. Visconti, *Helv.* 59, 242 (1976).
- [41] B.L. O'Dell, J.M. Vanderbelt, E.S. Bloom & J.J. Pfiffner, *J. Amer. chem. Soc.* 69, 250 (1947).
- [42] S. Futterman, *J. biol. Chemistry* 228, 1031 (1957).
- [43] R.L. Blakley, *Nature* 188, 231 (1960).
- [44] G.R. Greenberg, *Rôle of Folic Acid Derivatives in Purine Biosynthesis*, *Federat. Proc. (Amer. Soc. exp. Biol.)* 13, 745 (1954).
- [45] M. May, T.J. Bardos, F.L. Barger, M. Lansford, J.M. Ravel, G.L. Sutherland & W. Shive, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 3067 (1951).
- [46] M. Silverman & J.M. Noronha, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 180 (1961).
- [47] B.L. Hillcoat & R.L. Blakley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 303 (1964).
- [48] W. Frick, *Dissertation, Universität Zürich* 1975.
- [49] Y. Hatefi, M.J. Osborn, L.D. Kay & F.M. Huennekens, *J. biol. Chemistry* 227, 637 (1957).
- [50] C.K. Mathews & F.M. Huennekens, *J. biol. Chemistry* 235, 3304 (1960).
- [51] W. Shive, T.J. Bardos, T.J. Bond & L.L. Rogers, *J. Amer. chem. Soc.* 72, 2817 (1950).
- [52] E.H. Flynn, T.J. Bond, T.J. Bardos & W. Shive, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 1979 (1951).
- [53] J.A. Brockman, B. Roth, H.P. Broquist, M.E. Hultquist, J.M. Smith, Jr., M.J. Fahrenbach, D.B. Co-

- sulich, R.P. Parker, E.L.R. Stokstad & T.H. Jukes, J. Amer. chem. Soc. 72, 4325 (1950).
- [54] B. Roth, M.E. Hultquist, M.J. Fahrenbach, D.B. Cosulich, H.P. Broquist, J.A. Brockman, J.M. Smith, Jr., R.P. Parker, E.L.R. Stokstad & T.H. Jukes, J. Amer. chem. Soc. 74, 3247 (1952).
- [55] D.B. Cosulich, J.M. Smith, Jr. & H.P. Broquist, J. Amer. chem. Soc. 74, 4215 (1952).
- [56] W. Frick, R. Weber & M. Viscontini, Helv. 57, 2658 (1974).
- [57] H.-J. Furrer, J.H. Bieri & M. Viscontini, Helv. 61, 2744 (1978).
- [58] E. Khalifa, H.-J. Furrer, J.H. Bieri & M. Viscontini, Helv. 61, 2739 (1978).
- [59] D.B. Cosulich & J.M. Smith, Jr., J. Amer. chem. Soc. 71, 3574 (1949).
- [60] D.G. Johns, S. Sperti & A.S.V. Burgen, J. Clin. Invest. 40, 1684 (1961).
- [61] J.R. Bertino, D.G. Johns, P. Almquist, J.W. Hollingsworth & E.A. Evans, Nature 206, 1052 (1965).
- [62] S.F. Zakrzewski, E.A. Evans & R.F. Phillips, Anal. Biochem. 36, 197 (1970).
- [63] L. Palladino, D.L. Hacheg, J.A. Blair, I.H. Rosenberg & P.D. Klein, Presented at the Second International Conference on Stable Isotopes Conference, 751027-9.
- [64] D.B. Cosulich, B. Roth, J.M. Smith, Jr., M.E. Hultquist & R.P. Parker, J. Amer. chem. Soc. 73, 5006 (1951).
- [65] E. Khalifa, J.H. Bieri & M. Viscontini, Helv. 56, 2911 (1973).
- [66] P.K. Sengupta, J.H. Bieri & M. Viscontini, Helv. 58, 1374 (1975).

- [67] M. Viscontini & J.H. Bieri, *Helv.* 54, 2291 (1971).
- [68] M. Poe, *J. biol. Chemistry* 248, 7025 (1973).
- [69] J.C. Fontecilla-Camps, Ch.E. Bugg, C. Templè, Jr., J.D. Rose & J.A. Montgomery, "Chemistry and Biology of Pteridines", Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford 1979, S. 235.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn und Herrn Dr. W. Schwotzer für die Aufnahme der NMR.-Spektren sowie für ihre Hilfe bei deren Interpretation, Herrn Prof. Dr. M. Hesse und seiner Abteilung für die Aufnahme der Massenspektren sowie dem Leiter des Mikroanalyselabors, Herrn H. Frohofer.

LEBENS LAUF

Am 12. Mai 1939 wurde ich, Esam el-Din Khalifa, in Alexandria, Ägypten, geboren. Ich besuchte dort die Primar- und die Mittelschule, die ich 1956 mit der Maturität abschloss.

Im Wintersemester 1959/60 begann ich mein Studium an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich mit Hauptfach Chemie. Am Organisch-chemischen Institut diplomierte ich 1974 unter der Leitung von Prof. Dr. M. Viscontini mit einer Arbeit über Folsäure, Folsäurederivate und deren Synthese und begann anschliessend, wiederum unter der Leitung von Prof. Dr. M. Viscontini, mit der Dissertation, die ich im Frühjahr 1979 abschloss.

Von April 1975 bis Februar 1979 war ich Assistent im Praktikum für Sekundarlehrramtskandidaten.

Während meiner Studien besuchte ich Vorlesungen, Übungen und Praktika bei den folgenden Dozenten: A. Dreiding, C.H. Eugster, H. Fischer, M. Hesse, H. Labhart, F. Laves, W. Ludwig, V. Meyer, H. Oswald, W. von Philipsborn, H. Schmid, H. Staub, M. Viscontini, B. van der Waerden, G. Wagnière, H. Werner.

